

مطالعه مقایسه‌ای اجزای اسانس بالنگ، گریپ فروت و لیموشیرین و اثر مهارکنندگی آنها بر آنزیم استیل کولین استراز

رعنا اسفندیار و مریم مهاجرانی*

گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، مازندران، ایران

*نویسنده مسئول: Email: m.mohajerani@umz.ac.ir

چکیده

گیاهان دارویی از دیرباز برای درمان طیف وسیعی از بیماری‌ها مورد استفاده قرار گرفته‌اند. مرکبات، علاوه بر ارزش تغذیه‌ای، منابع غنی از ترکیبات زیست‌فعال با خواص آنتی‌اکسیدانی هستند. مهار استیل کولین استراز (AChE) یکی از مهم‌ترین راهبردهای درمانی در مدیریت بیماری آلزایمر به شمار می‌رود. هدف از این مطالعه، بررسی ترکیبات شیمیایی اسانس پوست بالنگ، گریپ فروت و لیموشیرین و همچنین ارزیابی اثر آن‌ها بر ویژگی‌های سینتیکی استیل کولین استراز بود. اسانس‌ها با استفاده از دستگاه کلونجر استخراج شدند و ترکیبات شیمیایی آن‌ها به وسیله کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنجی جرمی (GC-MS) شناسایی گردید. فعالیت آنزیم پس از انکوباسیون با غلظت‌های مختلف اسانس‌ها اندازه‌گیری شد و با بررسی تغییرات پارامترهای سینتیکی، میزان و نوع مهار آنزیم تعیین گردید. مونوترپن‌ها بیشترین سهم از ترکیبات تشکیل‌دهنده هر سه اسانس را به خود اختصاص دادند. اسانس لیموشیرین بیشترین اثر مهار را بر استیل کولین استراز نشان داد و در غلظت ۱/۴۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، ۶۰/۰۹ درصد مهار ایجاد کرد. مقادیر IC_{50} برای اسانس‌های بالنگ، گریپ فروت و لیموشیرین به ترتیب ۱/۴۲، ۱/۲۱ و ۱/۲۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. نتایج نشان داد که هر سه اسانس، فعالیت آنزیم استیل کولین استراز را به صورت وابسته به غلظت کاهش می‌دهند و به ترتیب از طریق مهار مختلط، رقابتی و نارقابتی عمل می‌کنند. تفاوت در نوع مهار احتمالاً ناشی از تفاوت در ترکیب شیمیایی این اسانس‌ها است. بر اساس نتایج این پژوهش، اسانس پوست مرکبات دارای ظرفیت قابل توجهی به عنوان مهارکننده طبیعی استیل کولین استراز بوده و می‌تواند به عنوان گزینه‌ای امیدبخش برای مطالعات بیشتر و توسعه فرآورده‌های طبیعی در راستای جایگزینی یا تکمیل داروهای سنتزی بیماری آلزایمر مورد توجه قرار گیرد.

واژگان کلیدی

گیاهان دارویی، مرکبات، روغن اسانسی، استیل کولین استراز، مهارکننده‌ها

مقدمه

گیاهان دارویی، گیاهان دارای مواد مؤثره‌ای می‌باشند که برای مداوای بیماری‌های زیادی مورد استفاده قرار می‌گیرند که این مواد در قسمت‌های مختلف گیاه ممکن است تشکیل شوند و معمولاً از اندام موردنظر به‌صورت تازه استفاده نمی‌شود [۱]. اخیراً علاقه شدیدی به محصولات طبیعی به دلیل در دسترس بودن آن‌ها، عوارض جانبی و سمیت کمتر به‌علاوه تجزیه بهتر در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های موجود و مواد نگهدارنده، وجود دارد [۲۱]. ترکیبات طبیعی استخراج شده از گیاهان فعالیت‌های مهم بیولوژیکی را نشان می‌دهند. در میان این ترکیبات طبیعی متنوع، روغن‌های اسانسی استخراج شده از گیاهان معطر، توجه ویژه‌ای را جذب می‌کنند. اسانس‌ها ترکیباتی طبیعی، پیچیده و فراری هستند که با بوی قوی توصیف می‌شوند و توسط گیاهان معطر به‌عنوان متابولیت‌های ثانویه شکل می‌گیرند. اسانس‌ها به‌وسیله همه ارگان‌های گیاهی از قبیل جوانه‌ها، گل‌ها، برگ‌ها، ساقه‌ها، شاخه‌های کوچک، بذور، میوه‌ها، ریشه‌ها، سلول‌های اپیدرمی و کانال‌ها و تریکوم غده‌ای می‌توانند سنتز شوند [۹]. از خانواده‌های مهم گیاهی که عمده اسانس‌ها از این خانواده‌ها به‌دست می‌آیند می‌توان به چتریان، مورد، افراییان یا کاسنی، نعنائیان، مرکبات و خانواده فلفل اشاره کرد [۱۵].

مرکبات متعلق به خانواده سدابیان و یکی از مهم‌ترین محصولات میوه جهان به‌شمار می‌روند. پوست میوه مرکبات حاوی اسانسی است که یک منبع غنی از ترکیب‌های معطر و دارویی به‌شمار می‌رود و به‌راحتی و با کمترین هزینه قابل استخراج است [۳۵]. اسانس مرکبات در بسیاری از محصولات، از جمله مواد غذایی، نوشیدنی، لوازم آرایشی و داروها به‌عنوان عوامل طعم‌دهنده و همچنین برای آروماتراپی نیز مورد استفاده قرار گرفته‌اند. آن‌ها همچنین به‌واسطه دارابودن خواص میکروب‌کشی، آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطانی نیز به‌شدت مورد توجه قرار گرفته‌اند [۱۷]. میوه بالنگ (*Citrus medica* L.) بیضی شکل با رنگ زرد لیمویی، پوست ضخیم و خشن با برجستگی‌های متورم شده، میوه آبدار، ترش و کمی تلخ‌مزه است [۵]. اسانس بالنگ به‌عنوان عامل خوشبوکننده در فرآورده‌های زیبایی، تولیدات غذایی و انواعی از مشروبات الکلی استفاده می‌شود [۲۳]. همچنین در درمان دیابت و بیماری آلزایمر و به‌عنوان یک آنتی‌بیوتیک کاربرد دارد [۶]. میوه گریپ فروت (*Citrus paradisi* L.) مدور بزرگ، به‌رنگ زرد لیمویی یا پرتقالی و به‌صورت انگور آویزان می‌شوند. بخش خوراکی میوه سبز یا صورتی و طعم آن ترکیبی از ترش، شیرین و تلخ است [۵]. میوه گریپ‌فروت خواص درمانی زیادی دارد و همچنین اسانس پوست میوه آن در صنایع غذایی، آرایشی و بهداشتی (در ساخت صابون‌ها و شامپوها و ...) کاربردهای فراوانی دارد. اسانس گریپ‌فروت در این محصولات باعث ایجاد خواص خنک‌کنندگی، پاک‌کنندگی و سم‌زدایی می‌شود [۶]. لیموشیرین (*Citrus limetta*) به علت طعم شیرین و ملایم مضرات احتمالی را که لیموترش برای اعصاب برخی افراد ممکن است داشته باشد را ندارد. لیموشیرین گلبول‌های سفید را تقویت و در بهبود برخی بیماری‌های ویروسی و کبدی اثر قابل توجهی دارد. از شیرهی آن برای درمان ابتلا به تب‌های عفونی استفاده می‌شود [۳]. لیموشیرین همانند سایر مرکبات به دلیل داشتن انواع ویتامین‌های آ، ب و ث در خود دارای فواید بیشماری می‌باشد [۴].

آنزیم استیل‌کولین‌استراز (AChE, EC 3.1.1.7) یک سرین پروتئاز، متعلق به خانواده کربوکسیل‌استرازها از گروه آنزیمی هیدرولازها می‌باشد [۲۴]. این آنزیم یک پروتئین α/β است که از ۵۳۷ اسیدآمینه تشکیل شده است و عمدتاً در سیناپس‌های کولینرژیک (سیناپس‌هایی که استیل‌کولین آزاد می‌کنند) و سیناپس‌های عصبی-عضله‌ای به‌عنوان آنزیمی کارآمد در سیستم اعصاب مرکزی تجمع پیدا کرده است [۱۲ و ۴۱]. نقش زیستی اصلی این آنزیم، خاتمه دادن به عبور

پیام عصبی در سیناپس‌های کولینرژیک از طریق هیدرولیز سریع استیل‌کولین است [۱۴]. استیل‌کولین در مهره‌داران و بندپایان یافت می‌شود و یکی از ترکیبات اصلی است که توسط آن تکانه‌های الکتریکی سلول‌های عصبی منتقل شده به سلول عصبی دیگر یا به عضلات ارادی و غیر ارادی، منتقل می‌شوند [۱۹]. استیل‌کولین در مغز به‌ویژه در بخشی از پیش‌مغز به‌نام هیپوکامپ (دم‌اسب) بسیار فراوان یافت می‌شود و آشکارا در بسیاری از اعمال عصبی مانند یادگیری، یادآوری و کنترل مرحله‌ای از خواب که رویا در آن به‌وقوع می‌پیوندد نقش دارد [۲۷]. در بیماری آلزایمر بخش‌هایی از مغز مرتبط با خاطرات، حافظه، یادگیری و پاسخ‌های حرکتی درگیر می‌شوند. ازدست‌دادن سلول‌های کولینرژیک پیش‌مغزی و کاهش دسترسی پذیری سیناپسی استیل‌کولین منجر به اختلالات شناختی در بیمار می‌شود. بنابراین منطقی‌ترین راه برای درمان بیماری، افزایش سیناپسی سطح استیل‌کولین در مغز با مهارکنندگی آنزیم استیل‌کولین‌استراز مسئول هیدرولیز استیل‌کولین، می‌باشد [۲۶]. گزارش شده است که بیماری آلزایمر بیشتر افراد سالخورده حدود ۶۵ سال و بالاتر را درگیر می‌کند که منجر به اختلال در حافظه و رفتار آن‌ها می‌شود. این بیماری به‌دلیل تأثیرات محیطی و ژنتیکی ایجاد می‌شود [۷].

براساس "نظریه کولینرژیک"، در این بیماری میزان استیل‌کولین در نورون‌های هیپوکامپ و مناطقی از مغز که مرتبط با حافظه و یادگیری است کاهش پیدا می‌کند [۲۲]. داروهای مهارکننده کولین‌استراز، با مهار فعالیت استیل‌کولین‌استراز، موجب کاهش سرعت تجزیه استیل‌کولین و حفظ سطح آن می‌گردند. بنابراین آن‌ها انتقال عصبی کولینرژیک را در نواحی قدامی مغز تقویت کرده و از بین رفتن عملکرد سلول‌های مغزی را جبران می‌کنند. داروهایی که در حال حاضر توسط آژانس‌های نظارتی مانند سازمان غذا و داروی آمریکا (FDA) و آژانس داروهای اروپایی (EMA) برای معالجه تظاهرات شناختی آلزایمر و بهبود کیفیت زندگی مورد تایید قرار گرفته‌اند، عبارتند از: دونپیزیل، ریواستیگمین و گالانتامین به‌عنوان مهارکننده‌های برگشت‌پذیر استیل‌کولین‌استراز و ممانتین به‌عنوان یک آنتاگونیست گیرنده NMDA [۱۲]. فرآیند درمان این بیماری بیشتر به‌منظور کنترل بیماری و جلوگیری از پیشرفت آن می‌باشد ولی سبب درمان قطعی بیماری نمی‌شود. لذا تلاش برای تولید داروهای کارآمدتر امری ضروری تلقی می‌گردد. همچنین باوجود فوایدی که این داروها داشته‌اند دارای اثرات جانبی‌ای مثل سمیت کبدی و اختلالات گوارشی نیز بوده‌اند. درنتیجه تلاش برای یافتن داروهای جدید همواره ضرورت دارد. در سال‌های اخیر، استفاده از گیاهان برای تولید دارو در درمان بیماری آلزایمر مورد توجه بوده است [۳۳].

باتوجه به اینکه مهارکننده‌های سنتزی استیل‌کولین‌استراز دارای عوارض جانبی ازجمله اختلالات دستگاه گوارش می‌باشند، پیدا کردن مهارکننده‌های موثر و قابل دسترسی و با عوارض جانبی کمتر از منابع طبیعی هدف بسیاری از محققین می‌باشد. لذا استخراج روغن اسانسی از پوست مرکبات روئیده در شمال ایران شامل گریپ‌فروت، لیموشیرین و بالنگ و شناسایی ترکیبات تشکیل‌دهنده آن‌ها به‌وسیله دستگاه کروماتوگرافی گازی-طیف سنجی جرمی و بررسی چگونگی اثر مهارکنندگی آن‌ها بر آنزیم استیل‌کولین‌استراز مغزگاو هدف این پژوهش درنظر گرفته شد.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی: استیل تیوکولین یداید (ATCI)، دی تیو دی نیترو دی بنزوئیک اسید (DTNB)، بافر سدیم فسفات، اتیلن دی آمین تترااستیک اسید، گالانتامین، متانول، سولفات آمونیوم، بیکربنات سدیم، سدیم سولفات، سرم آلبومین گاوی، بافر تریس، بافر گلايسين که همگی از شرکت های مرک، سیگما و فلوکا تهیه و خریداری شدند.

استخراج آنزیم استیل کولین استراز مغز گاو: یک عدد مغز گاو از کشتارگاه شهر بابل بلافاصله بعد از ذبح تهیه گردید و در ظرف حاوی یخ قرار داده شد. سپس در آزمایشگاه، با محلول نمک ۰/۹ درصد شسته شده و بخش خاکستری آن با اسکالپل جدا گردید. مقدار ۲۸۰ گرم بخش خاکستری در ۶۰۰ میلی لیتر بافر ۳۰ میلی مولار سدیم فسفات (pH=۷)، حدود ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد بوسیله هموژنایزر با سرعت ۳۴۰۰ دور در دقیقه هموژن گردید. محلول هموژن شده از طریق صافی پارچه‌ای صاف و سپس به مدت ۱۰ دقیقه و دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ (۵۰۰۰×g) گردید. محلول رویی با آمونیوم سولفات تا ۳۰ درصد اشباعی رسوب داده شد. پس از نگه داری به مدت ۴ ساعت در یخچال سانتریفیوژ و محلول رویی جدا شد. به این محلول سولفات آمونیوم تا ۷۰ درصد اشباعی اضافه و به مدت ۴ ساعت در یخچال قرار داده شد. رسوب حاوی آنزیم بعد از ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ بدست آمد و در کمترین حجم ممکن از بافر سدیم فسفات ۳۰ میلی مولار با pH=۷ سوسپانسیون و به مدت ۴۸ ساعت دیالیز شد. در نهایت عصاره آنزیمی از کیسه دیالیز در چند میکروتیوپ توزیع و در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد [۳۸ و ۴۰]. تعیین غلظت پروتئین: به روش برادفورد انجام و از آلبومین سرم گاوی به عنوان استاندارد استفاده شد [۱۱].

سنجش فعالیت آنزیم: اندازه‌گیری فعالیت آنزیم به روش المن انجام شد. اساس این روش اندازه‌گیری سرعت تولید تیوکولین به عنوان محصول کاتالیز آنزیمی می باشد. به ۴۰ میکرولیتر از آنزیم و ۲۹۲۰ میکرولیتر بافر سدیم فسفات ۳۰ میلی مولار pH=۷/۵ ۲۰ میکرولیتر از معرف DTNB ۱۰ میلی مولار اضافه و با ۲۰ میکرولیتر استیل تیو کولین یداید با غلظت ۷۵ میلی مولار انکوبه گردید. پس از افزودن سوبسترا، سرعت تولید تیوکولین با پیگیری واکنش آن با DTNB و تولید آنیون زرد رنگ ۲-نیترو-۵-مرکاپتوبنزوئیک اسید در طول موج ۴۱۲ نانومتر اندازه‌گیری شد. تغییرات جذب بر حسب زمان (دقیقه) در دستگاه اسپکتروفتومتر به مدت ۵ دقیقه ثبت شد. نمونه شاهد برای اندازه‌گیری‌ها شامل ۲۹۶۰ میکرولیتر از بافر سدیم فسفات و ۲۰ میکرولیتر DTNB و ۲۰ میکرولیتر سوبسترا بود [۳۹]. سپس با استفاده از فرمول های ۱ و ۲ فعالیت کل و فعالیت ویژه آنزیم بدست آورده شد [۴۴].

$$\text{فرمول ۱. تعیین فعالیت کل (U/mL)} \quad \text{Total Activity} = \frac{\Delta A \times V \times Df}{\epsilon \times y \times L}$$

در فرمول ۱، ΔA تغییرات جذب آنزیم در دقیقه، V حجم مورد سنجش (mL)، Df فاکتور رقت، ϵ ضریب خاموشی DTNB (که برابر ۰/۱۳۶ بر میلی مولار سانتیمتر می‌باشد)، y حجم آنزیم (mL) استفاده شده و L طول عبور نور (برابر یک سانتیمتر) می‌باشد.

$$\text{فرمول ۲. تعیین فعالیت ویژه} \quad \text{Specific Activity} = \frac{\text{Total Activity (U/ml)}}{[\text{Protein mg/ml}]}$$

تعیین $V_{\max}$ و K_m : برای تعیین پارامترهای سینتیکی $V_{\max}$ و K_m ، فعالیت آنزیم در دما و pH بهینه، به ازای غلظت های مختلف سوبسترا (استیل تیوکولین یداید) اندازه گیری شد. برای این منظور ابتدا سوبسترا در غلظت های ۵ تا ۹۰ میلی مولار در بافر سدیم فسفات ۰/۳ مولار در pH=۷/۵ تهیه شد. نمونه حاوی آنزیم با سوبسترا مخلوط و سپس فعالیت آنزیم اندازه گیری شد. با رسم نمودار سرعت به ازای غلظت های مختلف سوبسترا، نمودار میکائیلیس-منتن رسم شده و مقادیر K_m و $V_{\max}$ با رسم نمودار لاینیویربرگ بدست آورده شد [۳۱].

تهیه روغن اسانس: ۳ گونه از مرکبات شامل بالنگ، لیموشیرین و گریپ فروت از بازار محلی شهرستان ساری خریداری شد. پوست نازک میوه‌ها پس از شستشو از بخش خوراکی جدا و در دمای اتاق به دور از نور آفتاب به مدت یک

هفته خشک گردید. سپس با استفاده از آسیاب برقی پودر و جهت انجام آزمایش استفاده شدند. برای استخراج اسانس از مرکبات مورد بررسی از روش تقطیر با آب و دستگاه کلونجر استفاده شد. بدین منظور ۳۰ گرم از پودر پوست مرکبات خشک شده در بالن دستگاه اسانس‌گیری ریخته و به آن ۳۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه و به مدت ۲ تا ۳ ساعت حرارت داده شد تا اسانس‌گیری کامل شود. در پایان این مدت، برای جداسازی و استخراج اسانس مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر حلال هگزان اضافه شد. فاز غیرقطبی شامل اسانس با سرریز کردن از بخش قطبی (آب)، جدا شد. برای آب‌گیری از سدیم سولفات استفاده شد. سپس اسانس به‌دست آمده در بطری‌های کوچک تیره داخل یخچال و در دمای ۴ درجه سانتیگراد جهت آزمایشات بعدی نگهداری شد [۴۵].

جداسازی و شناسایی ترکیبات موجود در اسانس: جداسازی و شناسایی ترکیبات موجود در اسانس‌های بدست آمده با استفاده از کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنج جرمی انجام شدند. برای جداسازی از گاز حامل هلیوم با سرعت ۱ mL/min استفاده شد. برای شناسایی ترکیبات، از مقایسه طیف‌جرمی آن‌ها با طیف‌های موجود در داده‌های کتابخانه‌ای NIST، Wiley و طیف چند نمونه استاندارد (همراه با تزریق همزمان) استفاده شد [۲۸].

سنجش اثر اسانس‌ها بر آنزیم استیل کولین استراز: هریک از اسانس‌ها به وسیله بافر سدیم فسفات ۳۰ میلی مولار با pH=۷/۵ با رقت ۱:۲۰ رقیق شده و غلظت‌های ۰/۱۸، ۰/۵۴، ۰/۹۱ و ۱/۴۵ میلی گرم بر میلی لیتر از آنها برای انجام آزمایش در نظر گرفته شد. برای هر کدام از غلظت‌های اسانس‌ها پنج غلظت سوبسترا (استیل تیوکولین یداید) شامل ۵، ۳۰، ۵۵، ۸۰ و ۹۰ میلی مولار تعیین شد. در هر بار سنجش، در لوله آزمایش ۴۰ میکرولیتر عصاره حاوی آنزیم استیل کولین استراز و مقدار لازم از بافر سدیم فسفات ۳۰ میلی مولار با pH=۷/۵ و اسانس رقیق شده در غلظت‌های ذکر شده ریخته شد [۳۱]. بعد از ۱۰ دقیقه انکوبه شدن در دمای اتاق ۲۰ میکرولیتر DTNB ۱۰ میلی مولار و سپس ۲۰ میکرولیتر سوبسترا به محلول فوق اضافه تا به حجم نهایی ۳ میلی‌لیتر برسد. تغییرات جذب به مدت ۵ دقیقه در طول موج ۴۱۲ نانومتر ثبت شد. این اندازه‌گیری برای هر یک از غلظت‌های اسانس‌ها انجام شد. از محلول گالانتامین در متانول نیز به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. در نهایت منحنی جذب در برابر غلظت‌های مختلف سوبسترا برای هریک از اسانس‌ها و آنزیم رسم گردید و نوع مهارکنندگی اسانس مشخص شد [۴۵].

نتایج

آنالیز شیمیایی اسانس بالنگ، گریپ فروت و لیموشیرین

بازده اسانس‌گیری برای پوست میوه بالنگ ۶/۲۶ درصد (وزنی/وزنی) بدست آمد. نتایج تجزیه و تحلیل از روش کروماتوگرافی مجهز به طیف‌سنج جرمی به دست آورده شد. تعداد ۳۹ ترکیب در اسانس شناسایی شد که مونوترپن‌ها و سزکوئی‌ترین‌ها بیشترین درصد را دارند. در اسانس پوست میوه بالنگ تعداد ۳۹ ترکیب شناسایی شد (جدول ۱). ترکیبات تشکیل‌دهنده این اسانس شامل: مونوترپن‌ها (۸۶/۷۱)، مونوترپن‌های اکسیژنه (۲/۰۲)، سزکوئی‌ترین‌ها (۸/۴۹)، سزکوئی-ترین‌های اکسیژنه (۰/۵۲) و اسیدهای چرب (۰/۹۲) درصد محاسبه شد.

جدول ۱: ترکیبات موجود در اسانس پوست بالنگ

ردیف	ترکیب شیمیایی	RT ¹ (min)	درصد
۱	Alpha-Pinene	۱۱٫۸۵	۱٫۱۹
۲	Sabinene	۱۲٫۷۰	۰٫۴۵
۳	Beta-Pinene	۱۲٫۸۴	۲٫۱۸
۴	Beta-Myrcene	۱۳٫۰۸	۴٫۰۸
۵	D-Limonene	۱۴٫۲۱	۷۸٫۷۶
۶	Linalool oxide	۱۴٫۹۰	۰٫۲۹
۷	Linalool	۱۵٫۳۵	۰٫۶۰
۸	Trans-p-Mentha-2,8-dienol	۱۵٫۸۱	۰٫۰۵
۹	Cis-Limonene oxide	۱۶٫۰۶	۰٫۰۳
۱۰	Citronellal	۱۶٫۲۶	۰٫۰۴
۱۱	4-Terpinenol	۱۶٫۹۶	۰٫۰۶
۱۲	Alpha-Terpineol	۱۷٫۱۷	۰٫۴۷
۱۳	Camphene	۱۷٫۳۴	۰٫۰۵
۱۴	Cis-Carveol	۱۷٫۶۷	۰٫۰۳
۱۵	Nerol	۱۷٫۸۱	۰٫۰۳
۱۶	Citral	۱۷٫۹۰	۰٫۳۲
۱۷	Delta-Elemene	۲۰٫۰۲	۱٫۵۵
۱۸	Geranyl acetate	۲۰٫۳۲	۰٫۱۰
۱۹	Beta-Elemene	۲۰٫۸۰	۰٫۲۹
۲۰	Alpha-Bergamotene	۲۱٫۲۸	۱٫۷۵
۲۱	Longicyclene	۲۱٫۴۲	۰٫۰۱
۲۲	Caryophyllene	۲۱٫۵۲	۰٫۵۰
۲۳	Beta-farnesene	۲۱٫۷۸	۰٫۱۶
۲۴	Alpha-Humulene	۲۲٫۰۸	۰٫۱۷
۲۵	Alpha-Acoradiene	۲۲٫۲۹	۰٫۰۷
۲۶	Germacrene D	۲۲٫۵۰	۰٫۸۶
۲۷	Cis-Alpha-Bisabolene	۲۲٫۶۲	۰٫۲۵

¹ Retention time

۲۸	Beta-Bisabolene	۲۲٫۸۱	۲٫۱۷
۲۹	Alpha-Elemene	۲۳٫۱۱	۰٫۰۹
۳۰	Eremophilene(7CL)	۲۳٫۱۹	۰٫۱۰
۳۱	D-Camphene	۲۳٫۳۲	۰٫۱۸
۳۲	Gamma-Elemene	۲۳٫۵۴	۰٫۴۷
۳۳	Ledol	۲۴٫۶۲	۰٫۰۴
۳۴	Alpha-Gurjunene	۲۵٫۵۸	۰٫۰۴
۳۵	Alpha-Bisabolol	۲۵٫۸۴	۰٫۱۳
۳۶	Nootkatone	۲۸٫۱۲	۰٫۳۵
۳۷	Palmitic acid	۳۰٫۹۹	۰٫۱۸
۳۸	Linoleic acid	۳۴٫۴۸	۰٫۵۵
۳۹	Beta-Sitosterol	۳۵٫۰۳	۰٫۱۹
Total			۹۸٫۶۶

بازده اسانس گیری برای پوست گریپفروت از بالنگ کمتر بوده و ۵٫۲ درصد (وزنی/وزنی) بدست آمد. تعداد ۴۹ ترکیب در آن شناسایی شد که مونوترپن‌ها ۸۹٫۸۴ درصد، سزکوئی‌ترین‌ها ۷٫۷۱ درصد و بقیه را اسیدهای چرب شامل پالمیتیک-اسید و لینولئیک‌اسید، تشکیل داده‌اند. ترکیب‌های اصلی تشکیل‌دهنده این اسانس، دی-لیمونن، بتا-میرسن، کاریوفیلن، آلفا-پینن، بتا-فلاندرن و دلتا-کادینن بودند که به‌غیر از دی-لیمونن و بتا-میرسن و آلفا-پینن بقیه اجزای آن از اسانس بالنگ متفاوت می‌باشد.

جدول ۲: ترکیبات موجود در اسانس گریپفروت

ردیف	ترکیب شیمیایی	RT (min)	درصد
۱	Alpha-Pinene	۱۱٫۸۴	۱٫۶۳
۲	Beta-Phellandrene	۱۲٫۶۹	۱٫۳۹
۳	Beta-Myrcene	۱۳٫۰۶	۵٫۸۸
۴	Alpha-Thujene	۱۳٫۶۵	۰٫۰۵
۵	D-Limonene	۱۴٫۱۹	۷۵٫۵۷
۶	Gamma-Terpinene	۱۴٫۷۲	۰٫۱۵
۷	Cis-Linalool oxide	۱۴٫۸۹	۰٫۸۱
۸	Linalool	۱۵٫۳۵	۰٫۸۳
۹	Trans-Para-2,8-1-menthadienol	۱۵٫۸۱	۰٫۱۲

۱۰	Trans-Limonene oxide	۱۶,۱۲	۰,۰۸
۱۱	Citronellal	۱۶,۲۶	۰,۱۱
۱۲	4-Terpinenol	۱۶,۹۷	۰,۱۵
۱۳	Alpha-Terpineol	۱۷,۱۸	۰,۳۸
۱۴	Decanal	۱۷,۲۷	۰,۸۴
۱۵	Eucarvone	۱۷,۵۹	۰,۰۶
۱۶	Cis-Carveol	۱۷,۶۷	۰,۱۱
۱۷	Nerol	۱۷,۸۱	۰,۰۶
۱۸	D-Carvone	۱۸	۰,۰۸
۱۹	Perillaldehyde	۱۸,۵۷	۰,۲۰
۲۰	Neryl2-methyl butyrate	۱۹,۸۸	۰,۱۲
۲۱	2-Carene	۱۹,۹۶	۰,۱۴
۲۲	Neryl acetate	۲۰,۰۲	۰,۱۲
۲۳	Alpha-Cubebene	۲۰,۲۶	۰,۰۳
۲۴	Geranyl acetate	۲۰,۳۲	۰,۴۳
۲۵	Copaene	۲۰,۷۶	۰,۷۸
۲۶	Beta-Cubebene	۲۰,۹۲	۰,۷۸
۲۷	Alpha-Bergamotene	۲۱,۲۸	۰,۲۲
۲۸	Caryophyllene	۲۱,۵۳	۱,۹۵
۲۹	Beta-Farnesene	۲۱,۷۸	۰,۰۹
۳۰	Alpha-Humulene	۲۲,۰۸	۰,۳۹
۳۱	Alpha-Amorphene	۲۲,۳۶	۰,۰۷
۳۲	Germacrene D	۲۲,۵۰	۰,۶۵
۳۳	Seychellene	۲۲,۶۲	۰,۰۵
۳۴	Camphene	۲۲,۷۸	۰,۶۵
۳۵	Delta-Cadinene	۲۳,۱۱	۱,۰۷
۳۶	Alpha-Cedrene	۲۳,۳۱	۰,۰۲
۳۷	Alpha-Elemol	۲۳,۴۹	۰,۴۶
۳۸	Caryophyllene oxide	۲۴,۲۳	۰,۰۶
۳۹	Gamma-Gurjunene	۲۴,۳۱	۰,۱۴

۴۰	Beta-Cadinene	۲۵٫۰۶	۰٫۰۵
۴۱	Tau-Muurolol	۲۵٫۱۹	۰٫۱۱
۴۲	Alpha-Cadinol	۲۵٫۴۲	۰٫۱۸
۴۳	Nootkanone	۲۸٫۱۲	۰٫۴۹
۴۴	Methyl Palmitate	۳۰٫۲۲	۰٫۰۹
۴۵	Palmitic acid	۳۱٫۰۲	۰٫۲۷
۴۶	Methyl Linoleate	۳۳٫۵۴	۰٫۱۴
۴۷	Methyl (Z)-linoleate	۳۳٫۶۴	۰٫۱۱
۴۸	Linoleic acid	۳۴٫۵۱	۰٫۳۶
۴۹	(Z)-9,17-Octadecadienal	۳۵	۰٫۰۵
Total			۹۸٫۵۷

کمترین بازده اسانس گیری از پوست لیموشیرین و ۲٫۶ درصد (وزنی/وزنی) بدست آورده شد. تعداد ۴۲ ترکیب در اسانس شناسایی شد که ۹۱ درصد از آن را مونوترپن ها، ۷٫۳۹ درصد سزکوئی ترپن ها تشکیل می دهند. بیشترین ترکیب‌های تشکیل دهنده اسانس، دی-لیمونن، بتا-میرسن، بتا-بیسابولن، سیترونلال، آلفا-برگاموتن، لینالول و جرماکرن-دی نتیجه گیری شد (جدول ۳).

جدول ۳: ترکیبات موجود در اسانس لیموشیرین

ردیف	ترکیب شیمیایی	RT (min)	درصد
۱	Alpha-Pinene	۱۱٫۸۴	۰٫۸۵
۲	Beta-Thujene	۱۲٫۶۹	۰٫۲۰
۳	Beta-Terpinene	۱۲٫۸۱	۰٫۱۶
۴	Beta-Myrcene	۱۳٫۰۶	۳٫۹۳
۵	D-Limonene	۱۴٫۲۰	۸۱٫۰۸
۶	Linalool	۱۵٫۳۶	۱٫۳۹
۷	2-Methyl-6-methylene-1,7-octadien-3-one	۱۵٫۷۱	۰٫۰۳
۸	Citronellal	۱۶٫۲۹	۲٫۱۸
۹	Isopulegol	۱۶٫۵۹	۰٫۰۴
۱۰	4-Terpinenol	۱۶٫۹۶	۰٫۰۵
۱۱	Alpha-Terpineol	۱۷٫۱۷	۰٫۳۱
۱۲	Carvomenthenal	۱۷٫۵۶	۰٫۱۲
۱۳	Citronellol	۱۷٫۷۸	۰٫۰۷

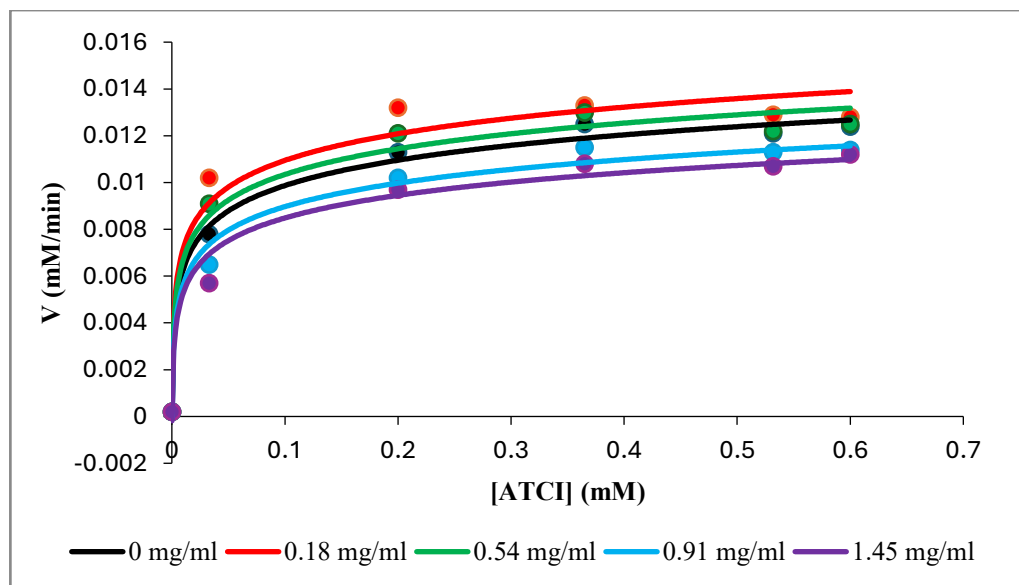
۱۴	Citral	۱۷,۹۰	۰,۱۲
۱۵	D-Carvone	۱۷,۹۹	۰,۰۵
۱۶	Perillaldehyde	۱۸,۵۷	۰,۰۶
۱۷	Methyl geranate	۱۹,۳۸	۰,۱۰
۱۸	2,6-dimethyl-2,6-octadiene	۱۹,۸۸	۰,۲۱
۱۹	Delta-Elemene	۲۰,۰۲	۰,۳۳
۲۰	Alpha-Cubebene	۲۰,۲۶	۰,۰۳
۲۱	Geraniol acetate	۲۰,۳۲	۰,۰۵
۲۲	Copaene	۲۰,۷۶	۰,۰۳
۲۳	Beta-Elemene	۲۰,۹۲	۰,۱۴
۲۴	Alpha-Bergamotene	۲۱,۲۸	۱,۶۸
۲۵	Caryophyllene	۲۱,۵۲	۰,۳۱
۲۶	(Z)-Beta-Farnesene	۲۱,۷۸	۰,۰۸
۲۷	Epi-Beta-Santalene	۲۲,۰۷	۰,۱۱
۲۸	Alpha-Acoradiene	۲۲,۳۰	۰,۰۸
۲۹	Germacrene D	۲۲,۵۱	۱,۲۳
۳۰	Cis-Alpha-Bisabolene	۲۲,۶۲	۰,۲۸
۳۱	Beta-Bisabolene	۲۲,۸۱	۲,۲۳
۳۲	Delta-Cadinene	۲۳,۱۰	۰,۰۹
۳۳	Ledene	۲۳,۱۹	۰,۰۵
۳۴	Alpha-Caryophyllene	۲۳,۳۲	۰,۱۰
۳۵	D-Nerolidol	۲۳,۵۵	۰,۱۲
۳۶	Alpha-Bisabolol	۲۵,۸۷	۰,۲۲
۳۷	14-Methyl-8-hexadecyn-1-ol	۲۷,۴۲	۰,۱۲
۳۸	Nootkanone	۲۸,۱۲	۰,۱۶
۳۹	Palmitic acid	۳۱,۰۲	۰,۱۶
۴۰	Linoleic acid	۳۴,۵۰	۰,۶۵
۴۱	Oleic acid	۳۴,۹۹	۰,۰۴
۴۲	Isopropyl linoleate	۴۲,۲۳	۰,۰۴
Total			۹۹,۲۸

فعالیت آنزیم استیل کولین استراز مغز گاو

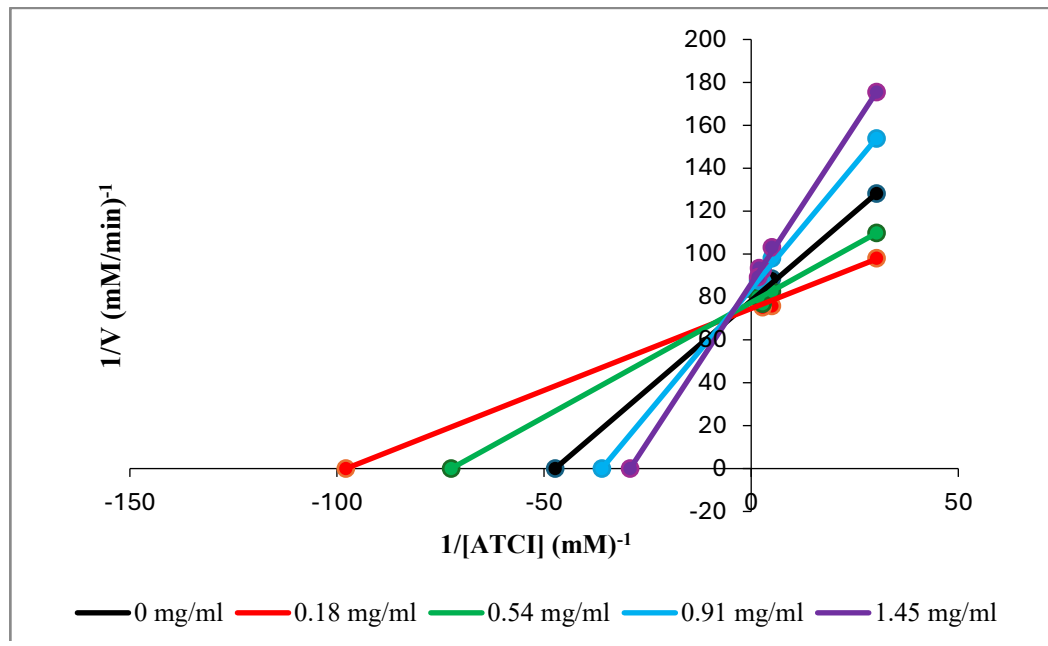
براساس اندازه‌گیری‌های انجام شده پروتئین تام در عصاره آنزیمی بدست آمده از مغز گاو ۴/۸۹ میلی گرم بر میلی لیتر، فعالیت آنزیم ۴/۴۱ واحد آنزیمی بر میلی لیتر و ویژه آنزیم ۰/۹ واحد آنزیمی بر میلی گرم عصاره آنزیمی از فرمول‌های ۱ و ۲ بدست آورده شد. با استفاده از معادله میکائیلیس-منتن و رسم نمودار لاینویور برگ، با افزایش غلظت سوبسترا، سرعت واکنش افزایش یافته و تا زمانی که آنزیم از سوبسترا اشباع شود این روند ادامه می‌یابد و بعد از اشباع شدن آنزیم با افزایش غلظت، تغییرات سرعت واکنش ثابت باقی ماند. به این ترتیب با استفاده از اطلاعاتی که از نمودارها نتیجه‌گیری می‌گردد، K_m آنزیم استیل کولین استراز مغز گاو، ۰/۰۲ میلی‌مولار و V_{max} آن، ۰/۰۱۲ میلی‌مولار بر دقیقه بدست آورده شد.

بررسی رفتار سینتیکی آنزیم استیل کولین استراز و اسانس بالنگ، گریپ فروت و لیموشیرین

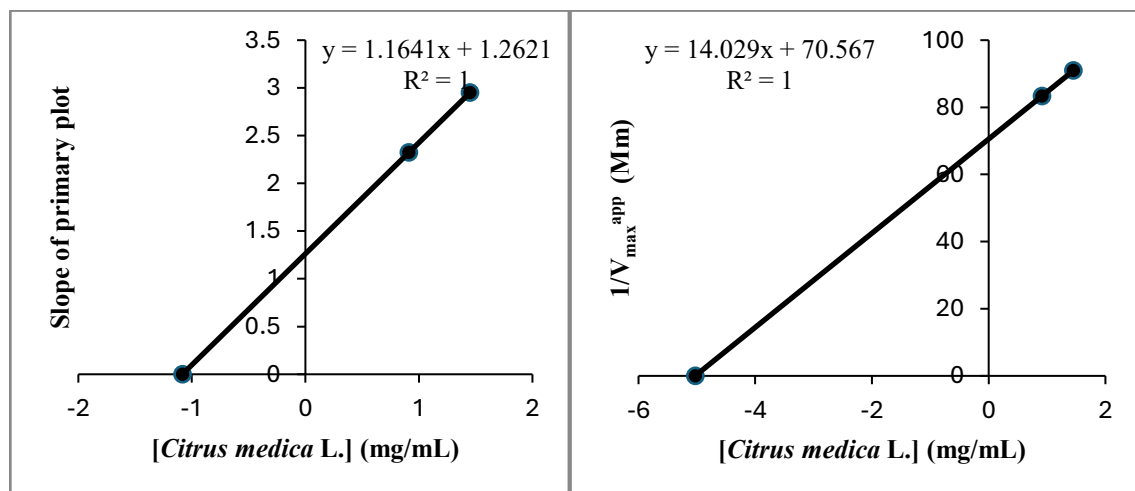
پس از انکوبه کردن آنزیم با غلظت‌های مختلف اسانس بالنگ (شکل ۵-۱)، اسانس گریپ فروت (شکل ۱۰-۶) و اسانس لیموشیرین (شکل ۱۱-۱۵) فعالیت آنزیم اندازه‌گیری شد و نمودارهای میکائیلیس منتن و لاینویور برگ و همینطور تغییرات فعالیت آنزیم تحت تاثیر اسانس‌ها آورده شده است.



تصویر ۱: نمودار میکائیلیس-منتن سرعت واکنش استیل کولین استراز مغز گاو در حضور مقادیر مختلف اسانس بالنگ

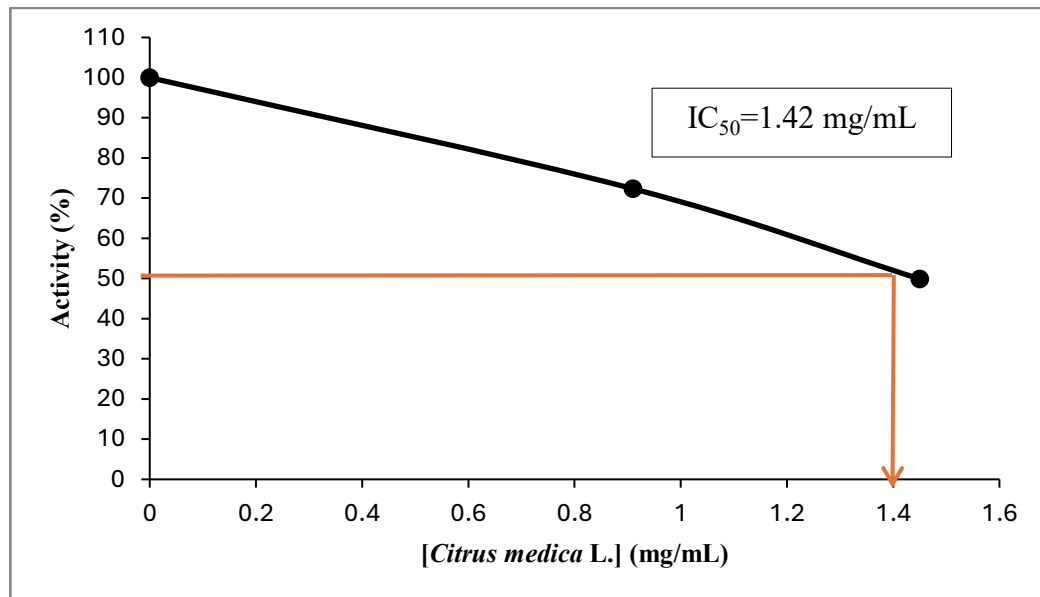


تصویر ۲: نمودار لاینویوربرگ معکوس سرعت استیل کولین استراز مغزگاو در حضور مقادیر مختلف اسانس بالنگ

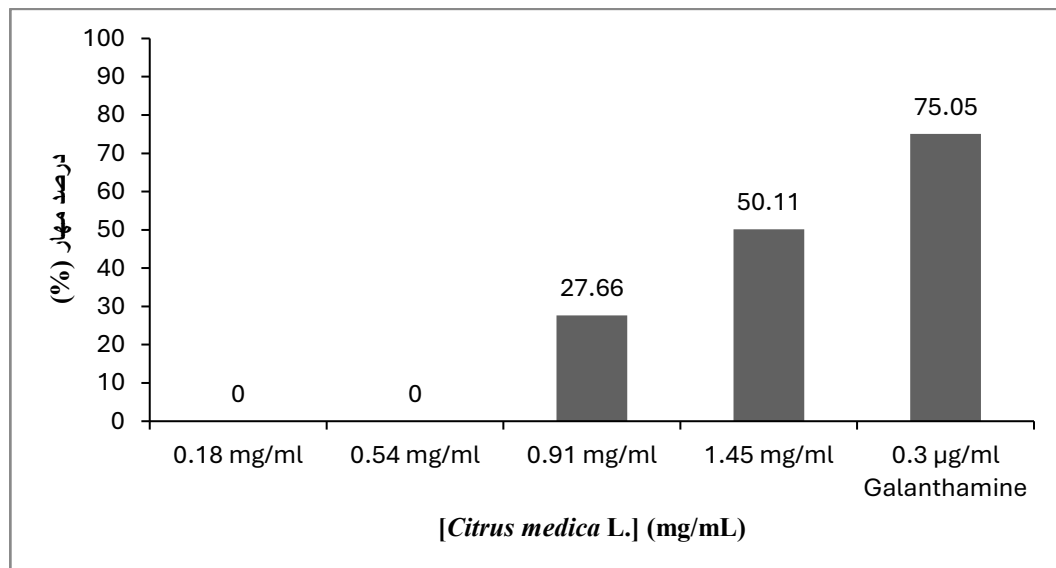


تصویر ۳: الف) تغییرات معکوس سرعت ماکزیمم ظاهری آنزیم نسبت به غلظت اسانس بالنگ (KI) ب) تغییرات شیب نمودار اولیه

نسبت به غلظت اسانس بالنگ (Ki)، $KI > Ki$

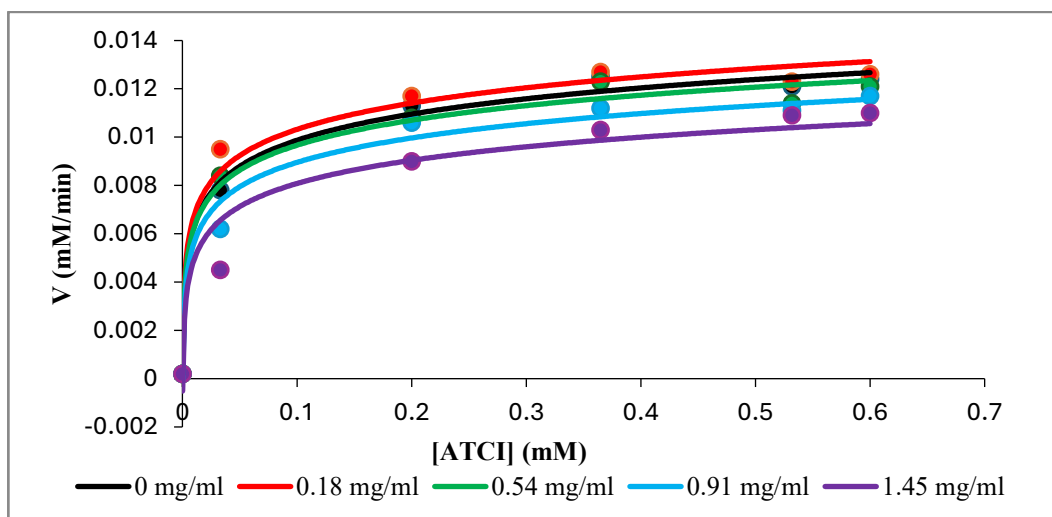


تصویر ۴: تغییرات فعالیت آنزیم نسبت به غلظت اسانس بالنگ

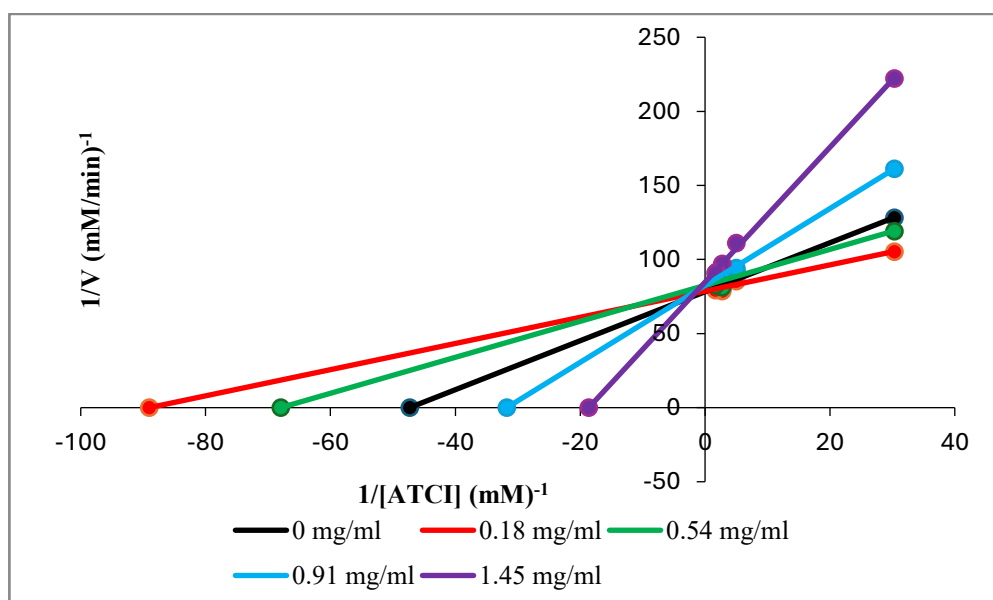


تصویر ۵: نمودار بستگی میزان مهار آنزیم با افزایش مقدار اسانس بالنگ در مقایسه با گالانتامین به عنوان کنترل مثبت

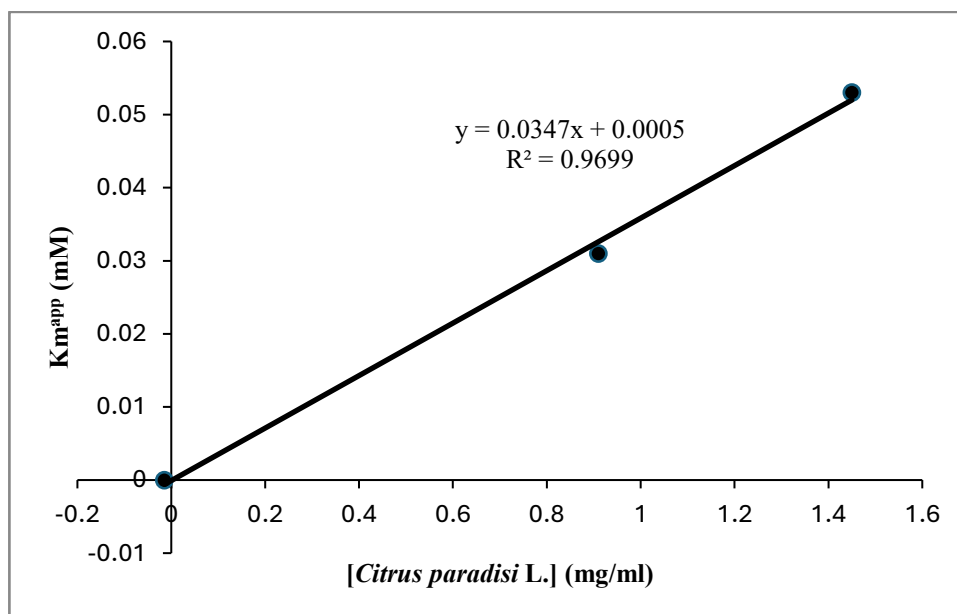
V_{max} ظاهری به ترتیب 0.034 میلی مولار و 0.011 میلی مولار بر دقیقه بوده و در غلظت $1/42$ میلی گرم بر میلی لیتر، فعالیت آنزیم را به مقدار 50 درصد کاهش داده است. اسانس بالنگ در غلظت‌هایی نظیر 0.091 و $1/45$ میلی گرم بر میلی لیتر اثر مهارکنندگی روی آنزیم دارد. مطابق ثابت‌های آماری بدست‌آمده که $K_i=1/08$ و $K_I=5/03$ میلی مولار بدست‌آمده، K_I بزرگتر از K_i می‌باشد. بنابراین مهار مختلط به صورت رقابتی-غیررقابتی است.



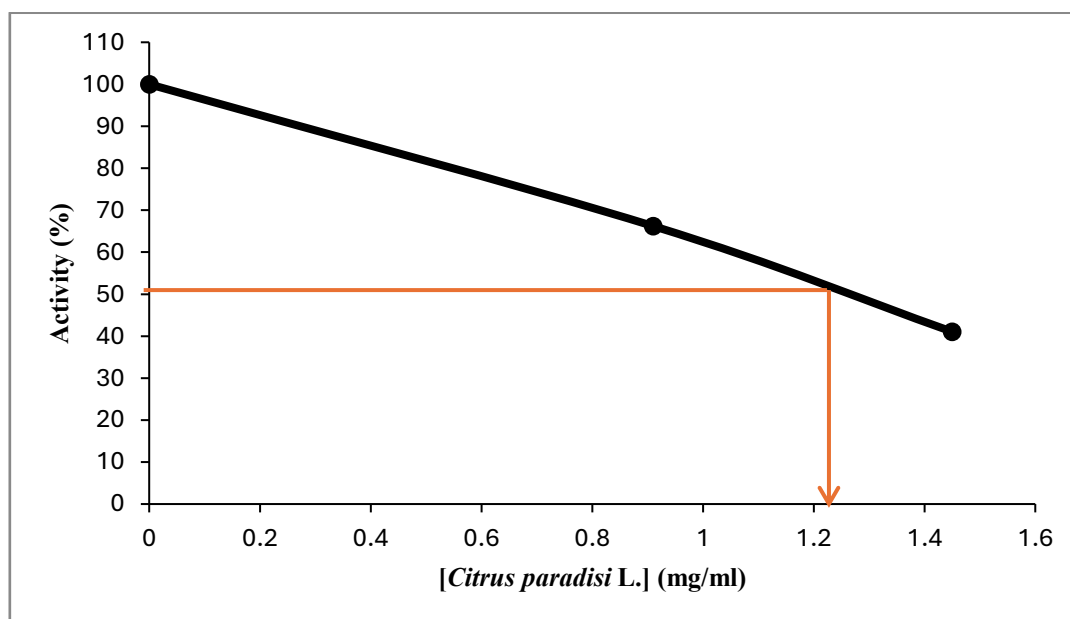
تصویر ۶: نمودار میکائیلیس-منتن سرعت واکنش استیل کولین استراز مغز گاو در حضور اسانس گریپ فروت



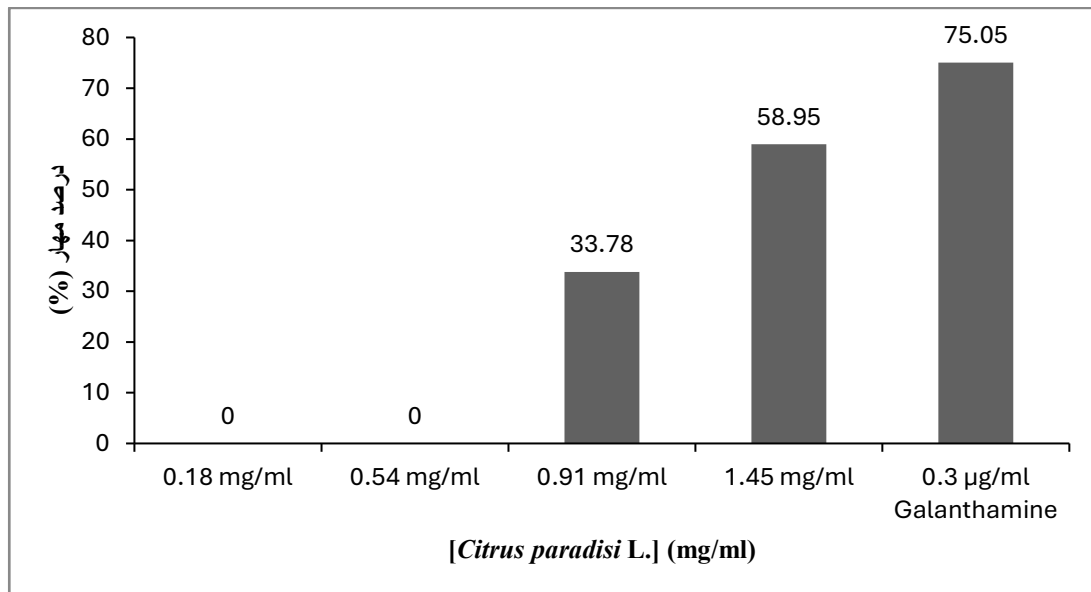
تصویر ۷: نمودار لاینویربرگ استیل کولین استراز مغز گاو در حضور اسانس گریپ فروت



تصویر ۸: تغییرات ثابت میکائیلیس ظاهری آنزیم نسبت به غلظت اسانس گریپفروت

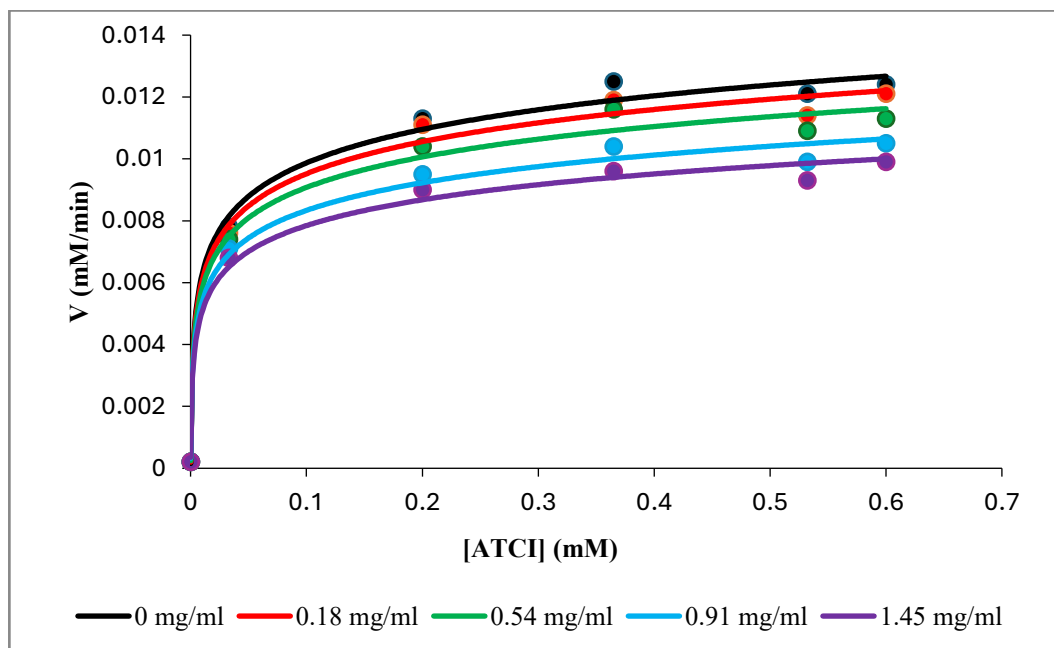


تصویر ۹: تغییرات فعالیت آنزیم نسبت به غلظت اسانس گریپفروت

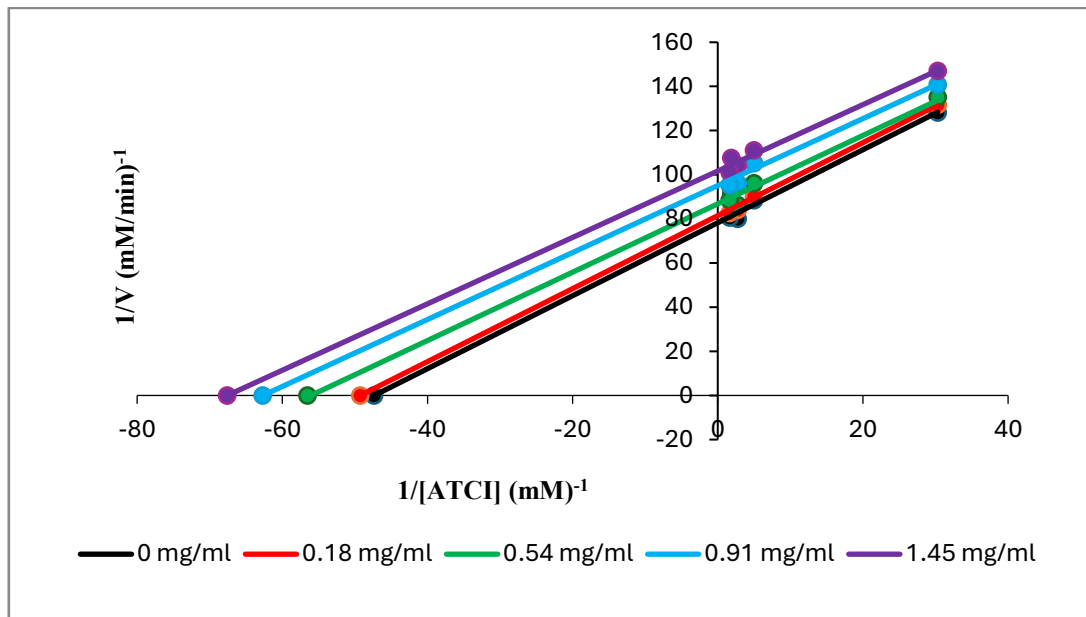


تصویر ۱۰: نمودار بستگی میزان مهار آنزیم با افزایش مقدار اسانس گریپ‌فروت در مقایسه با گالانتامین به عنوان کنترل مثبت

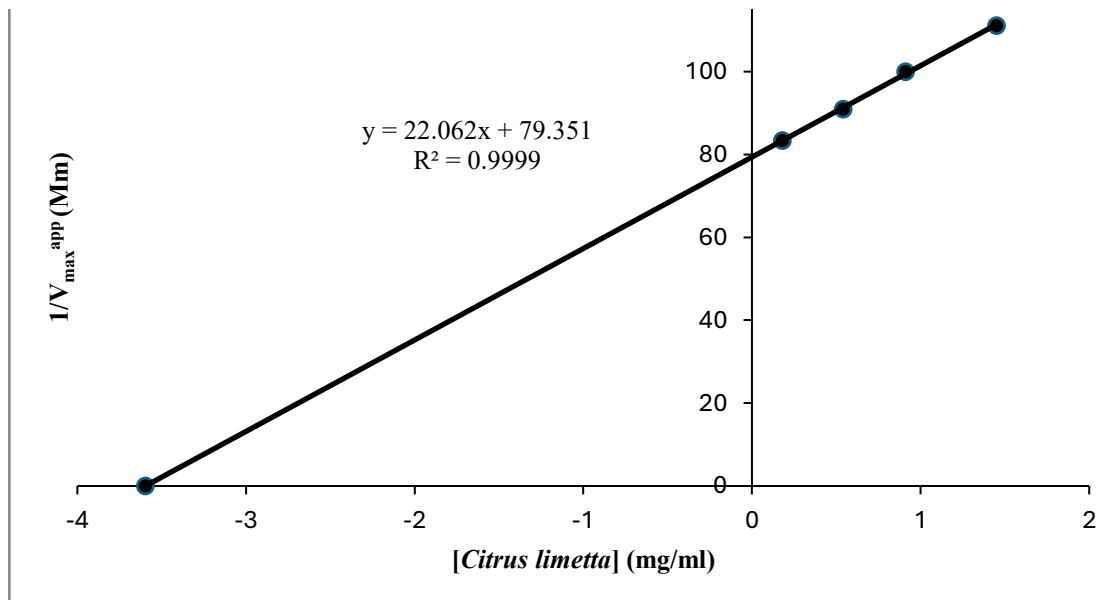
استیل کولین استراز در غلظت ۱/۴۵ میلی گرم بر میلی لیتر از اسانس گریپ‌فروت، K_m و V_{max} ظاهری به ترتیب ۰/۰۵۳ میلی‌مولار و ۰/۰۱۲ میلی‌مولار بر دقیقه نشان داد. این اسانس در غلظت ۰/۱۸ و ۰/۵۴ میلی گرم بر میلی لیتر موجب کاهش پارامتر K_m برای آنزیم استیل کولین استراز شده ولی در غلظت ۱/۴۵ میلی گرم بر میلی لیتر موجب مهار ۵۹ درصدی آنزیم استیل کولین استراز شده و نوع مهارکنندگی این اسانس از نوع رقابتی نتیجه گیری شد.



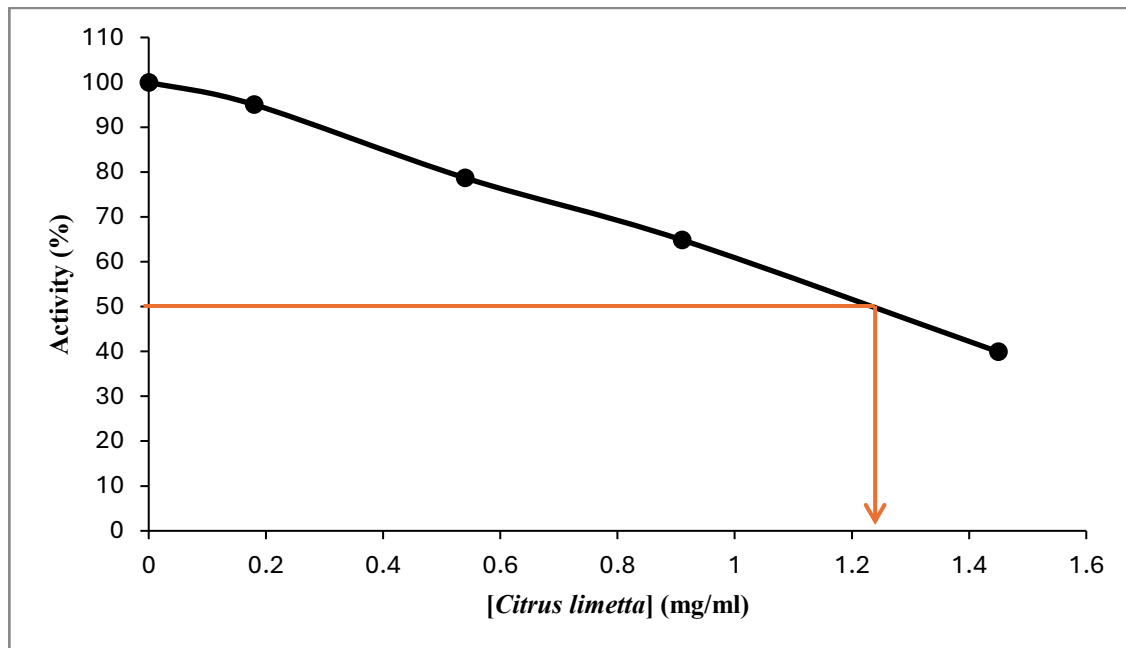
تصویر ۱۱: نمودار میکائیلیس-منتن سرعت واکنش استیل کولین استراز در حضور اسانس لیموشیرین



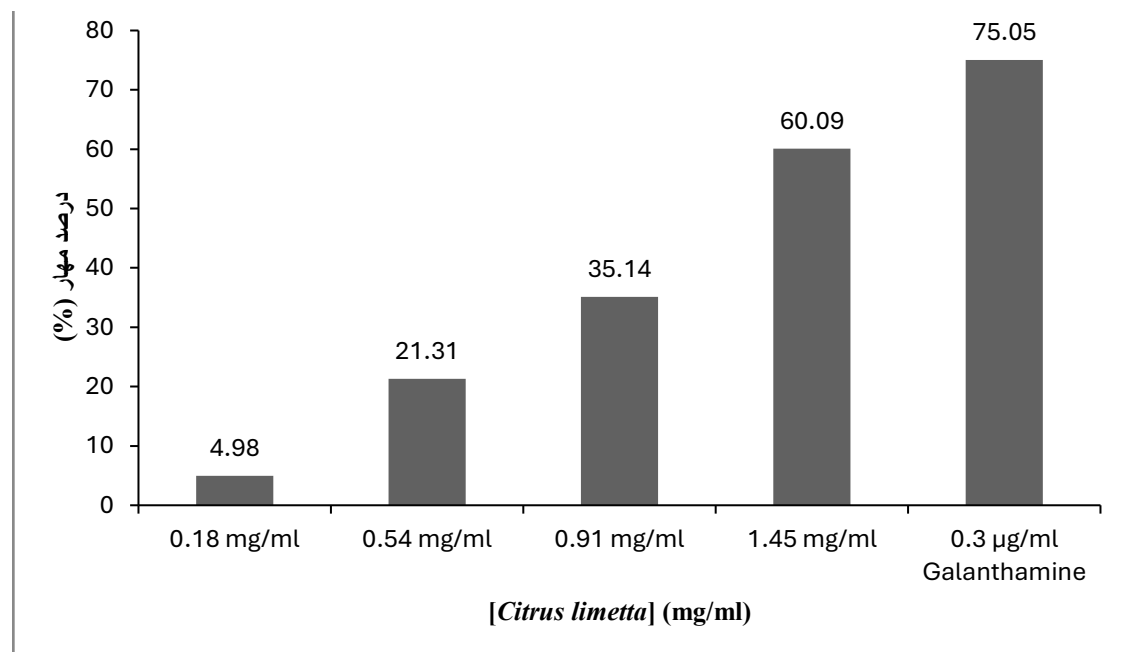
تصویر ۱۲: نمودار لاینوایربرگ معکوس سرعت استیل کولین استراز در حضور اسانس لیموشیرین



تصویر ۱۳: تغییرات معکوس سرعت ماکزیمم ظاهری آنزیم نسبت به غلظت اسانس لیموشیرین



تصویر ۱۴: تغییرات فعالیت آنزیم نسبت به غلظت اسانس لیموشیرین



تصویر ۱۵: نمودار بستگی میزان مهار آنزیم با افزایش مقدار اسانس لیموشیرین در مقایسه با گالاتامین به عنوان کنترل مثبت

اسانس لیموشیرین موجب کاهش K_m و V_{max} ظاهری آنزیم شده و در غلظت ۱/۴۵ میلی گرم بر میلی لیتر، K_m و V_{max} ظاهری به ترتیب ۰/۰۱۴ میلی مولار و ۰/۰۰۹ میلی مولار بر دقیقه و درصد مهار کنندگی آن ۶۰/۰۹ و اثر مهار کنندگی از نوع نارقابتی نشان داد. ترکیبات این اسانس اثر مهار کنندگی بر روی آنزیم داشته و در ۱/۲۳ میلی گرم بر میلی لیتر فعالیت آنزیم را به مقدار ۵۰ درصد کاهش داده و مقدار ثابت بازدارندگی K_i برای آن ۳/۵۹ میلی مولار بدست آورده شد. با توجه به نمودار ۱۲، نوع مهار نارقابتی بود. در این نوع مهار کنندگی، مهار کننده به جایگاهی بر روی کمپلکس سوپسترا-آنزیم متصل شده و موجب کاهش K_m و V_{max} گردیده است.

بحث

متن بیماری آلزایمر یک بیماری وابسته به سن است فرآیندی که با کاهش پیشرونده حافظه، کاهش مهارت‌های کلامی و سایر اختلالات شناختی مشخص می‌شود [۳۶]. مهار استیل کولین استراز به عنوان راهکاری برای درمان بیماری آلزایمر، زوال عقل، آتاکسی، میاستنی گراویس و بیماری پارکینسون به کار گرفته شده است. از آنجا که که چند داروی سنتزی نظیر تاکرین و دونپزیل و محصول طبیعی ریواستیگمین و گالانتامین دارای عوارض جانبی از جمله اختلالات دستگاه گوارش و مشکلات مرتبط با فراهمی زیستی می‌باشند تلاش برای جستجوی مهارکننده‌های بهتر استیل کولین استراز از منابع طبیعی ادامه دارد [۳۲].

متابولیت‌های ثانویه گیاهان با خصوصیات ساختاری مختلف مانند استرولها، ترپنوئیدها، فلاونوئیدها و ترکیبات فنلی به عنوان مهارکننده‌های استیل کولین استراز با عوارض جانبی کمتر و داروهایی امیدوارکننده برای پیشگیری و درمان بیماری آلزایمر شناخته شده‌اند [۲۰]. درحال حاضر، روغن‌های اسانس به عنوان داروهای احتمالی آینده در پیشگیری از اختلالات عصبی مرتبط با مغز مانند بیماری آلزایمر در نظر گرفته می‌شوند [۲۸]. درواقع، نتایج مطالعات اخیر نشان داده که چندین روغن اسانس از محصولات غذایی و گیاهان دارویی بر فعالیت استیل کولین استراز تاثیر دارند. اثرات اجزای مختلف اسانس‌ها روی استیل کولین استراز مورد بررسی قرار گرفته و گزارش شده که اکثر آنها از ترپنوئیدها هستند. باتوجه به اندازه مولکولی کوچک و لیپوفیل بودن آنها، ترکیبات فرار روغن‌های اسانس به راحتی می‌توانند از سد خونی مغز عبور کنند [۱۰]. از طرفی کاربرد دارویی اسانس مرکبات نیز درحال افزایش است؛ زیرا بسیاری از ترکیب‌های موجود در این اسانس‌ها دارای اثرات درمانی بوده و در صنایع دارویی حائز اهمیت هستند. ترکیب سیترونلال موجود در مرکبات یک ترکیب آرامش‌بخش بوده و در درمان بیماران مبتلا به افسردگی و بیماری‌های روانی کاربرد دارد [۴۲]. اسانس روغنی مرکبات حاوی ۸۵ تا ۹۹ درصد مواد فرار و ۱ تا ۱۵ درصد اجزای غیرفرار هستند. لیمونن اصلی‌ترین جزء شیمیایی اسانس مرکبات بوده که بین ۳۲ تا ۹۸ درصد از آن را تشکیل می‌دهد [۱۶]. تعداد زیادی از اسانس‌ها و ترکیبات مونوترپنه آنها بر روی آنزیم استیل کولین استراز اثر مهارکنندگی نشان داده‌اند. از طرفی در چندین مطالعه بر روی مغز گاو گزارش شد که به عنوان منبعی سرشار از استیل کولین استراز می‌تواند موضوع تحقیق بیوشیمیدان‌ها واقع شود [۳۷]. اسانس پوست نارنج تونسسی با درصد بالای لیمونن (۸۷/۵۲۳٪) نشان داد که اسانس تام و لیمونن هردو اثر مهارکنندگی بر آنزیم استیل کولین استراز از نوع غیررقابتی دارند اما اسانس کامل آن برای آلودگی یک منطقه با آفت‌ها اثر بهتری از لیمونن خالص نشان داد [۲۸]. اسانس گیاه مرزنجوش اثر مهارکننده بر فعالیت استیل کولین استراز و به صورت وابسته به غلظت با $IC_{50} = 36/40$ میکروگرم بر میلی لیتر نشان داده است. مهمترین ترکیب‌های شناسایی شده در اسانس این گیاه شامل: ۴-ترپینئول (۲۹/۹۷٪)، گاما-ترپینن (۱۵/۴۰٪)، ترانس-ساینن هیدرات (۱۰/۹۳٪)، آلفا-ترپینن (۶/۸۶٪)، ۳-سیکلوهگزن متانال ۴-تری متیل (۶/۵۴٪) که ۶۹/۷۰ درصد کل اسانس را تشکیل می‌دهند. محتوای بالای مونوترپن‌های هیدروکربنه یا اکسیژنه در اسانس مرزنجوش علت مهار آنزیم شناخته شد [۲۵]. در مطالعه‌ای دیگر اسانس گیاه مریم گلی از خانواده نعنائیان استخراج شد و با استفاده از کروماتوگرافی گازی-طیف سنجی جرمی، ۵۴ ترکیب در اسانس این گیاه شناسایی شد که ترکیبات اصلی آن شامل: جرماکرن دی (۲۵/۰۳٪)، بتا-کاریوفیلین (۸/۷۱٪)، اسپاتونول (۵/۸۶٪)، آلفا-هومولن (۴/۸۲٪) بود. اسانس گیاه مریم گلی در این مطالعه اثر مهارکنندگی درحد متوسط روی آنزیم استیل کولین استراز نشان داده است [۴۰].

فعالیت آنزیم استیل کولین استراز در مجاورت اسانس نعنا وحشی بررسی شده است. ترکیبات اصلی شناسایی شده در اسانس این گیاه شامل: ۱ و ۸-سینئول، لینالول، منتون، ترانس-پیپریتون اکسید، پولگون، پیپریتون اکسید گزارش شد. اندازه‌گیری فعالیت آنزیم نشان داد که مونوترپن‌های اکسیژنه عامل اصلی در مهار آنزیم می‌باشند. اسانس این گونه نعنا دارای ترکیبات بارزش زیست فعال بوده و به دلیل خواص آنتی اکسیدانی و پتانسیل مهار آنزیم‌های مهم در بیماری‌هایی از قبیل دیابت، آلزایمر و اختلالات پوستی دلیل پتانسیل بالای این اسانس برای استفاده در صنایع داروسازی، آرایشی و غذایی پیشنهاد شده است [۸].

دو ترکیب لینالول و سیترال به عنوان مهارکننده‌های برگشت‌پذیر و رقابتی استیل کولین استراز حشرات معرفی شده‌اند. این مطالعه نشان داد که این ترپن‌های طبیعی دقیقاً مانند حشره کش‌های شیمیایی نظیر متیل کرباماتها و اورگانوفسفاتها در جایگاه فعال آنزیم با برهمکنش‌های هیدروفوبی استقرار یافته و از اتصال سوپسترای آنزیم ممانعت می‌کنند. از طرفی اثر مهارکنندگی چای کوهی بر آنزیم استیل کولین استراز به مونوترپن‌های اصلی شناسایی شده در اسانس آن شامل آلفا-پینن، ۱ و ۸ سینئول و کامفور نسبت داده شد و نوع مهار از نوع برگشت‌پذیر رقابتی بر آنزیم استیل کولین استراز گزارش شد [۳۴].

دو ترکیب لیمونن و گاما-ترپینن ترکیبات اصلی روغن اسانسی لیمو بوده و تأثیر قوی در آزادسازی مونوآمین‌هایی مانند دوپامین، نوراپی‌نفرین و سروتونین از بافت مغز نشان داده‌اند [۱۸]. از طرفی فعالیت مهارکنندگی ۱۷ نوع از مونوترپن‌ها بر آنزیم استیل کولین استراز به روش ال‌من بررسی شده که از بین آنها گاما-ترپینن و ۴-ترپینئول در غلظت ۱/۲ میلی مولار به ترتیب ۲۲/۶٪ و ۲۱/۴٪ مهار آنزیم را نشان دادند [۴۲]. از ترپن‌های دیگری مانند لیمونن و لینالول در غلظت ۱۶۴ میکروگرم بر میلی لیتر به ترتیب درصد مهارکنندگی ۲۷٪ و ۳۷٪ گزارش شده است [۳۰]. در مطالعه حاضر نیز در هماهنگی با گزارشات گذشته وجود دو ترکیب دی لیمونن و بتا میرسن در هر سه اسانس احتمالاً علت اصلی رفتار سینتیکی از نوع مهارکنندگی برای آنزیم استیل کولین استراز می‌باشد. به علت محتوای بالای این دو ترکیب در اسانس لیمو شیرین بیشترین قدرت مهارکنندگی برای آن مشاهده شد. از طرفی تفاوت در اجزای دیگر نظیر دلتا-المن در اسانس بالنگ، کاریوفیلن، بتافلاندرن و دلتا-کادینن در اسانس گریپ فروت و وجود ترکیباتی نظیر سیترونلال، لینالول و جرماکرن-دی در اسانس لیمو شیرین و اثرهای هم‌افزایی بین این ترکیبات احتمالاً علت تفاوت در نوع رفتار مهارکنندگی آنها در برابر آنزیم بوده است. در جدول ۷ اجزای اصلی تشکیل دهنده اسانس بالنگ، گریپ فروت و لیمو شیرین

جدول ۷: مقایسه ترکیبات اصلی تشکیل دهنده اسانس بالنگ، گریپ فروت و لیمو شیرین

ترکیب	بالنگ	گریپ فروت	لیمو شیرین
دی-لیمونن	۷۸٫۷۶	۷۵٫۵۷	۸۱٫۰۸
بتا-میرسن	۴٫۰۸	۵٫۸۸	۳٫۹۳
بتا-پینن	۲٫۱۸	-	-
بتا-بیسابولن	۲٫۱۷	-	۲٫۲۳

آلفا-برگاموتن	۱/۷۵	-	۱/۶۸
دلنا-المن	۱/۵۵	-	-
آلفا-پینن	۱/۱۹	۱/۶۳	-
کاریوفیلین	-	۱/۹۵	-
بتا-فلاندرن	-	۱/۳۹	-
دلنا-کادینن	-	۱/۰۷	-
سیترونلال	-	-	۲/۱۸
لینالول	-	-	۱/۳۹
جرماکرن-دی	-	-	۱/۲۳
نوع مهارکنندگی	مختلط	رقابتی	نارقابتی

نتیجه‌گیری

از این مطالعه نتیجه‌گیری می‌شود که علت مهار استیل کولین استراز احتمالاً وجود دو ترکیب دی‌لیمون و بتا میرسن در هر سه اسانس می‌باشد. اسانس لیموشیرین بیشترین مقدار دی-لیمون نسبت به بالنگ و گریپ فروت و دارای بیشترین قدرت مهارکنندگی می‌باشد. بنابراین مرکبات و ترکیبات موجود در آنها پتانسیل لازم برای مطالعات بعدی و پژوهش‌های آینده در زمینه مهار آنزیم استیل کولین استراز را دارا می‌باشند.

تضاد منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ تضاد منافی ندارند.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه مازندران به خاطر حمایت‌های مالی در انجام این تحقیق تشکر و قدردانی می‌کنند.

منابع

- ۱- امیدبیگی، رضا. تولید و فرآوری گیاهان دارویی. انتشارات آستان قدس رضوی، (۱۳۸۸)، ۳۴۸ صفحه.
- ۲- فرزاد، محمدعلی. پرورش، باغداری مرکبات (کاشت، داشت و برداشت) آفات، امراض، گندها، چین و طرز نگهداری. تهران: انتشارات آموزش و ترویج کشاورزی. (۱۳۸۹). صفحه ۶۶.
- ۳- زرگری، علی. گیاهان دارویی. ویرایش دوم. تهران: موسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران. (۱۳۹۰). جلد اول. صفحه ۵۰۶.

۴- دریایی، محمدرسلول. معجزات غذایی و درمانی مرکبات (لیموترش و لیموشیرین). تهران: انتشارات سفید ابردهال. (۱۳۸۶).
صفحه ۱۳۴-۱۳۸.

۵- دلفر فرتیس، ولفانگ. ترجمه دکتر محمود عظیمی تبریزی. مرکبات، کاشت، تغذیه. انتشارات دانشگاه شهید چمران. (۱۳۶۹).
صفحه ۲۴۸

6- Adedeji GB. Fagade OE. Oyelade AA. (2007). Prevalence of *Pseudomonas aeruginosa* in clinical samples and its sensitivity to citrus extract. African Journal of Biomedical Research. 10: 183-187.

7- Ajayi OS. Aderogba MA. Obuotor EM. Majinda RRT. (2019). Acetylcholinesterase inhibitor from *Anthocleista vogelii* leaf extracts. Journal of Ethnopharmacology. 231: 503-506.

8- Asghari B. Zengin G. Bahadori MB. Abbas-Mohammadi M. Dinparast L. (2018). Amylase, glucosidase, tyrosinase, and cholinesterases inhibitory, antioxidant effects, and GC-MS analysis of wild mint (*Mentha longifolia* var. *calliantha*) essential oil: A natural remedy. European Journal of Integrative Medicine. 22: 44-49.

9- Bakkali F. Averbeck S. Averbeck D. Idaomar M. (2008). Biological effects of essential oils-a review. Food and chemical toxicology. 46: 446-475.

10- Bonesi M. Menichini F. Tundis R. Loizzo MR. Conforti F. Passalacqua NG. et.al. (2010). Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of Pinus species essential oils and their constituents. Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry. 25: 622-628.

11-Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry. 72: 248-254.

12- Colovic MB. Krstic DZ. Lazarevic-Pasti TD. Bondzic AM. Vasic VM. (2013). Acetylcholinesterase inhibitors: Pharmacology and toxicology. Current neuropharmacology. 11: 315-335.

13- Conforti F. Statti GA. Tundis R. Loizzo MR. Menichini F. (2007). *In vitro* activities of *Citrus medica* L. cv. Diamante (Diamante citron) relevant to treatment of diabetes and Alzheimer's disease. Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives. 21: 427-433.

14- Dvir H. Silman I. Harel M. Rosenberry T. Sussman J. (2010). Acetylcholinesterase: from 3D structure to function. Chemico-Biological Interactions. 187: 10-22.

15- Enan E. (2001). Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 130(3), 325-337.

16- Espina L. Somolinos M. Lorán S. Conchello P. Garcia D. Pagán R. (2011). Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. Food control. 22: 896-902.

17- Ferhat M.A. Meklati BY. Chemat F. (2007). Comparison of different isolation methods of essential oil from Citrus fruits: cold pressing, hydrodistillation and microwave 'dry'distillation. Flavour and Fragrance Journal. 22: 494-504.

- 18- Fukumoto S. Sawasaki E. Okuyama S. Miyake Y. Yokogoshi H. (2006). Flavor components of monoterpenes in citrus essential oils enhance the release of monoamines from rat brain slices. *Nutritional neuroscience*. 9: 73-80.
- 19- Houghton PJ. Ren Y. Howes MJ. (2006). Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. *Natural Product Reports*. 23: 181-199.
- 20- Howes MJR. Perry NS. Houghton PJ. (2003). Plants with traditional uses and activities, relevant to the management of Alzheimer's disease and other cognitive disorders. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*. 17: 1-18.
- 21- Kalembe DAAK. Kunicka A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current medicinal chemistry*. 10: 813-829.
- 22- Lahiri DK. Farlow MR. Greig NH. Sambamurti K. (2002). Current drug targets for Alzheimer's disease treatment. *Drug Development Research*. 56: 267-281.
- 23- Lota ML. de Rocca Serra D. Tomi F. Bessiere JM. Casanova J. (1999). Chemical composition of peel and leaf essential oils of *Citrus medica* L. and *C. limonimeditica* Lush. *Flavour and fragrance journal*. 14: 161-166.
- 24- Liao J. Boschetti N. Mortensen V. Jensen SP. Koch C. Norgaard-Pedersen B. Brodbeck U. (1994). Characterization of Salt-Soluble Forms of Acetylcholinesterase from Bovine Brain. *Journal of Neurochemistry*. 63: 1446-1453.
- 25- Maláková J. Nobilis M. Svoboda Z. Lída M. Holčápek M. Květina J. Palička V. (2007). High-performance liquid chromatographic method with UV photodiode-array, fluorescence and mass spectrometric detection for simultaneous determination of galantamine and its phase I metabolites in biological samples. *Journal of Chromatography B*. 853: 265-274.
- 26- Manetsch R. Krasinski A. Radic Z. Raushel J. Taylor P. Sharpless KB. Kolb HC. (2004). *In situ* click chemistry: enzyme inhibitors made to their own specifications. *Journal of the American Chemical Society*. 126: 12809-12818.
- 27- Mantoani SP. Chierrito TP. Vilela AF. Cardoso CL. Martinez A. Carvalho I. (2016). Novel triazole-quinoline derivatives as selective dual binding site acetylcholinesterase inhibitors. *Molecules*. 21: 1-12.
- 28- Marchev A. Ivanov I. Denev P. Nikolova M. Gochev V. Stoyanova A. Georgiev V. (2015). Acetylcholinesterase inhibitory, antioxidant, and antimicrobial activities of *Salvia tomentosa* Mill. essential oil. *Journal of BioScience & Biotechnology*. 4: 219-229.
- 29- Miyazawa M. Watanabe H. Kameoka H. (1997). Inhibition of acetylcholinesterase activity by monoterpenoids with ap-menthane skeleton. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45: 677-679.
- 30- Miyazawa M. Watanabe H. Umemoto K. Kameoka H. (1998). Inhibition of acetylcholinesterase activity by essential oils of *Mentha* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46: 3431-3434.

- 31- Mohadjerani M. Rasolizadeh A. (2020). Evaluation of Kinetic Parameters of Acetylcholinesterase from the Bovine Brain and its Inhibition with *Mentha pulegium* L. Extract. Scientific journal of Ilam university of medical sciences. 27: 74-88.
- 32- Mukherjee PK. Kumar V. Mal M. Houghton PJ. (2007). Acetylcholinesterase inhibitors from plants. Phytomedicine. 14: 289-300.
- 33- Nochi S. Asakawa N. Sato T. (1995). Kinetic study on the inhibition of acetylcholinesterase by 1-benzyl-4-[(5, 6-dimethoxy-1-indanon)-2-yl] methylpiperidine hydrochloride (E2020). Biological and Pharmaceutical Bulletin. 18: 1145-1147.
- 34- Perry NS. Houghton PJ. Jenner P. Keith A. Perry EK. (2002). *Salvia lavandulaefolia* essential oil inhibits cholinesterase *in vivo*. Phytomedicine. 9: 48-51.
- 35- Poiana M. Sicari V. Mincione B. (1998). A comparison between the chemical composition of the oil, solvent extract and supercritical carbon dioxide extract of *Citrus medica* cv. Diamante. Journal of Essential Oil Research. 10: 145-152.
- 36- Richmond V. Murray AP. Maier MS. (2013). Synthesis and acetylcholinesterase inhibitory activity of polyhydroxylated sulfated steroids: structure/activity studies. Steroids. 78: 1141-1147.
- 37- Sadighara P. Ashrafi Helan J. Barin A. Esfahani T. (2009). Histopathology and cholinergic assessment of *Pterocarya fraxinifolia* on chicken embryo. Interdisciplinary toxicology. 2: 254-256.
- 38- Silman I. Sussman JL. (2008). Acetylcholinesterase: How is structure related to function? Chemico-biological interactions. 175: 3-10.
- 39- Son JY. Shin S. Choi KH. Park IK. (2002). Purification of soluble acetylcholinesterase from Japanese quail brain by affinity chromatography. The international journal of biochemistry & cell biology. 34: 204-210.
- 40- Tel G. Öztürk M. Duru ME. Harmandar M. Topçu G. (2010). Chemical composition of the essential oil and hexane extract of *Salvia chionantha* and their antioxidant and anticholinesterase activities. Food and Chemical Toxicology. 48: 3189-3193.
- 41- Tripathi A. Srivastava UC. (2008). Acetylcholinesterase: a versatile enzyme of nervous system. Annals of Neurosciences. 15: 106-111.
- 42- Weiss EA. (1997). Essential oil crops. Cab International. Printed and bound in the UK. University Press, Cambridge. London. 600P.
- 43- Wessler I. Michel-Schmidt R. Kirkpatrick CJ. (2015). pH-dependent hydrolysis of acetylcholine: Consequences for non-neuronal acetylcholine. International immunopharmacology. 29:27-30.
- 44- Wszelaki N. Kuciun A. Kiss A. (2010). Screening of traditional European herbal medicines for acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity. Acta Pharmaceutica. 60: 119-128.
- 45- Zarrad K. Hamouda AB. Chaieb I. Laarif A. Ben Jemâa JM. (2015). Chemical composition, fumigant and anti-acetylcholinesterase activity of the Tunisian *Citrus aurantium* L. essential oils. Industrial Crops and Products. 76: 121-127.

A comparative study on constituents of *Citrus medica*, *Citrus paradisi* and *Citrus limetta* essential oils and their inhibitory effect on acetylcholinesterase

Rana Esfandiar and Maryam Mohadjerani*

Department of molecular and cell biology, Faculty of basic sciences, University of Mazandaran. Babolsar, Iran.

* *Corresponding author: Email: m.mohajerani@umz.ac.ir*

Abstract

Medicinal plants have been used since ancient times to treat a wide range of diseases. In addition to their nutritional value, citrus fruits are rich sources of bioactive compounds with potent antioxidant properties. Inhibition of acetylcholinesterase (AChE) is a key therapeutic strategy for the management of Alzheimer's disease. This study investigated the chemical composition of essential oils extracted from the peels of citron, grapefruit, and sweet lemon, as well as their inhibitory effects on the kinetic properties of AChE. Essential oils were extracted using a Clevenger apparatus, and their chemical constituents were identified by gas chromatography–mass spectrometry. AChE activity was measured following incubation with different concentrations of the essential oils. Enzyme kinetic parameters were analyzed to determine the inhibitory effects and mechanisms of inhibition. Monoterpenes were the predominant constituents of all three essential oils. Sweet lemon essential oil exhibited the strongest inhibitory activity against AChE, achieving 60.09% inhibition at a concentration of 1.45 mg/mL. The IC₅₀ values for citron, grapefruit, and sweet lemon essential oils were 1.42, 1.21, and 1.23 mg/mL, respectively. Kinetic analysis revealed that citron, grapefruit, and sweet lemon essential oils inhibited AChE in a concentration-dependent manner through mixed, competitive, and uncompetitive mechanisms, respectively. The observed differences in the modes of inhibition are likely attributable to variations in the chemical composition of the essential oils. These findings suggest that citrus peel essential oils possess promising acetylcholinesterase inhibitory activity and may serve as potential natural candidates for further investigation in the development of alternative or complementary therapies for Alzheimer's disease.

Key words: Medicinal plants, Citrus, Essential oil, Acetylcholinesterase, Inhibitors.