

## بررسی فعالیت مهارکنندگی آنزیم استیل کولین استراز عصاره برخی گونه‌های جنس *Ferula*

مریم شکرچی<sup>1</sup>، هما حاجی مهدی پور<sup>2\*</sup>، فرزانه نقیبی<sup>3</sup>، لیلا آرا<sup>4</sup>، حمید مؤذنی ذهان<sup>5</sup>

- 1- دانشیار، اداره کل آزمایشگاه‌های کنترل غذا و دارو و مرکز تحقیقات آزمایشگاهی غذا و دارو، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، تهران، ایران
  - 2- استادیار، مرکز تحقیقات طب سنتی و مفردات پزشکی و گروه داروسازی سنتی، دانشکده طب سنتی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
  - 3- دانشیار، مرکز تحقیقات طب سنتی و مفردات پزشکی و گروه داروسازی سنتی، دانشکده طب سنتی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
  - 4- کارشناس، مرکز تحقیقات طب سنتی و مفردات پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
  - 5- دانشجوی دکتری، مرکز تحقیقات طب سنتی و مفردات پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
- \*آدرس مکاتبه: تهران، خیابان ولیعصر، روبروی توانیر، کوچه شمس، دانشکده طب سنتی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تلفن و نمابر: 88776027 (021)  
پست الکترونیک: hmehdipoor@itmrc.org، hajimehd@sbmu.ac.ir

تاریخ دریافت: 91/8/16

تاریخ تصویب: 92/2/31

### چکیده

مقدمه: امروزه یکی از روش‌ها جهت مهار پیشرفت بیماری آلزایمر تجویز داروهای مهارکننده آنزیم کولین استراز (AChEI) می‌باشد. دستیابی به داروهایی با اثرات بهتر و عوارض جانبی کمتر بخصوص با منشای گیاهی هدف بسیاری از محققین می‌باشد. هدف: اصلی این تحقیق بررسی اثرات مهاری تعدادی از گونه‌های گیاهی متعلق به جنس *Ferula* روی فعالیت آنزیم استیل کولین استراز بوده است.

روش بررسی: عصاره تام شش گیاه متعلق به جنس *Ferula* شامل *F. ovina*، *F. oopoda*، *F. hirtella*، *F. hezarlalezarica*، *F. persica* var. *persica* و *F. szowitsiana* با استفاده از حلال متانول 80 درصد و فراکسیون‌های مختلف هر گیاه به ترتیب با استفاده از حلال‌های هگزان، کلروفرم، اتیل استات، متانول، متانول 50 درصد و آب با روش ماسراسیون به دست آمدند. اثر مهار آنزیم استیل کولین استراز عصاره‌ها در غلظت 300 میکروگرم بر میلی‌لیتر با روش Ellman در میکروپلیت‌های 96 خانه و در طول موج 405 نانومتر تعیین شد.

نتایج: نتایج نشان دادند که در میان نمونه‌های مورد بررسی فراکسیون کلروفرمی گونه *F. persica* var. *persica* دارای اثرات AChEI قابل قبولی بوده است (27/3 درصد). سایر عصاره‌ها فاقد اثر بوده یا اثرات ناچیزی داشته‌اند.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد که ترکیبات نسبتاً غیرقطبی گیاه *F. persica* var. *persica* دارای اثرات AChEI می‌باشند و با توجه به وجود سزکویی‌ترین کومارین‌ها به عنوان ترکیبات شاخص جنس *Ferula*، شاید بتوان این ترکیبات را عامل اصلی اثرات مهار آنزیمی این گیاه دانست ولی اثبات این امر نیاز به تحقیقات بیشتر دارد.

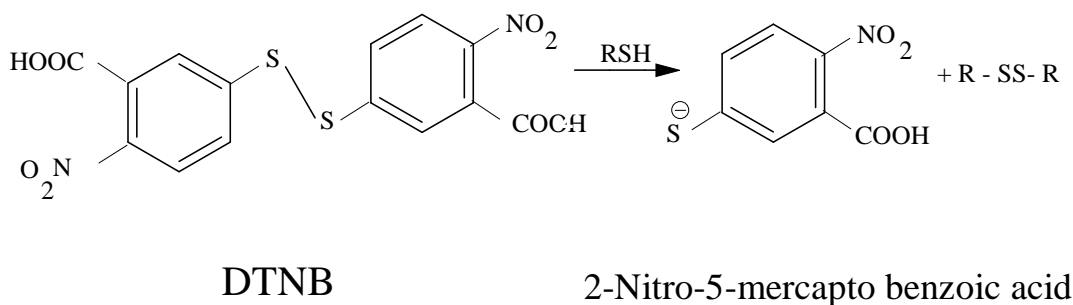
گل‌واژگان: آلزایمر، چتریان، روش Ellman، مهار استیل کولین استراز، *Ferula*



## مقدمه

هستند تا به داروهای جدیدی دست یابند که علاوه بر داشتن اثرات بهتر، عوارض جانبی کمتری نیز داشته باشند و گیاهان از منابعی هستند که همواره جهت یافتن داروهای جدید مورد توجه بوده‌اند. از آنجا که اثرات مهارکنندگی آنزیم استیل کولین استراز برخی از ترکیبات کومارینی به اثبات رسیده است [8 - 6] بنابراین با بررسی اثرات AChEI گیاهان حاوی کومارین‌ها امکان دستیابی به داروهای جدیدی در درمان آلزایمر وجود دارد. اثرات AChEI به شیوه‌های مختلف مورد بررسی قرار می‌گیرد. یکی از روش‌های معمول بررسی فعالیت AChEI گیاهان و ترکیبات مختلف استفاده از روش Ellman می‌باشد. اساس این روش اندازه‌گیری سرعت تولید تیوکولین به عنوان محصول کاتالیز آنزیمی به روی استیل تیوکولین یداید (ATCI) به عنوان سوبسترا می‌باشد. تیوکولین به محض تولید با دی تیو دی نیترو دی بنزوئیک اسید (DTNB) واکنش می‌دهد تا آنیون زرد رنگ 2- نیترو - 5- مرکاپتو بنزوئیک اسید ایجاد شود (شکل شماره 1). سرعت ایجاد رنگ در طول موج 405 نانومتر به وسیله دستگاه الیزاریدر اندازه‌گیری می‌شود [10].

گیاهان تیره چتریان فراوانی زیادی در سراسر دنیا دارند. یکی از جنس‌های متعلق به این تیره است که پراکندگی وسیع و اثرات درمانی زیادی دارد. این جنس در ایران 31 گونه گیاهی داشته که 16 گونه آن اندمیک می‌باشند [1]. برخی از گونه‌های این جنس در طب سنتی ایران در رفع بیماری‌هایی با منشأ عصبی استفاده می‌شوند [۲،۳]. بیشتر این گیاهان به علت سرشار بودن از ترکیبات کومارینی شهرت دارند [4]. کومارین‌ها از متابولیت‌های ثانویه گیاهان محسوب می‌شوند که اثرات متعدد بیولوژیک از آنها گزارش شده است [5]. یکی از این خواص که امروزه نظر محققین را به خود جلب نموده است، اثرات مهارکنندگی آنزیم استیل کولین استراز (AChEI) می‌باشد [6 - 8]. استیل کولین در روند بیماری آلزایمر دخیل می‌باشد به طوری که در این بیماری میزان آن کاهش می‌یابد. این ماده توسط آنزیم استیل کولین استراز از بین می‌رود بنابراین یکی از راه‌های ممانعت از کاهش استیل کولین مغزی در بیماری آلزایمر جلوگیری از تخریب این ماده توسط مهار آنزیم مخرب آن است [9]. داروهای امروزی مانند دونپزیل با این مکانیسم عمل می‌کنند. محققین دائماً در تلاش



شکل شماره 1- واکنش بین DTNB و گروه تیول ایجاد شده در اثر کاتالیز آنزیم

فاقد شماره هرباریومی می‌باشد. گیاهان جمع‌آوری شده در سایه خشک و آسیاب شدند.

### تهیه عصاره تام آبی - متانولی گیاه

100 گرم از پودر هر گیاه به روش ماسراسیون با استفاده از حلال متانول: آب 80:20 به نسبت 1:10 به مدت چهار روز عصاره‌گیری شد. پس از گذشت هر 24 ساعت مخلوط گیاه حلال صاف شده و حلال جدید به باقیمانده گیاه اضافه شد. عصاره به دست آمده توسط دستگاه تقطیر در خلأ در دمای 40 درجه سانتی‌گراد و سپس توسط دستگاه فریز درایر تا حد خشک شدن تغلیظ شد و تا قبل از استفاده در یخچال نگهداری شد.

### تهیه فراکسیون‌های مختلف از گیاهان با استفاده از حلال‌های مختلف

جهت تهیه فراکسیون‌های مختلف از هر گیاه به ترتیب از حلال‌های هگزان، کلروفرم، اتیل استات، متانول، متانول 50 درصد و آب استفاده شد. بدین ترتیب که هر حلال به نسبت 1:10 روی پودر گیاه ریخته شد و به مدت 24 ساعت توسط دستگاه شیکر بهم زده شد. بعد از گذشت 24 ساعت مخلوط صاف شده و حلال جدید به باقیمانده گیاه اضافه شد. این روند برای چهار روز ادامه یافت و بعد از صاف کردن مخلوط در روز چهارم باقیمانده گیاه خشک شده و حلال دوم به آن اضافه شد و این مراحل تا حلال پایانی (آب) ادامه یافت. عصاره‌های به دست آمده از هر حلال با یکدیگر مخلوط شده و توسط دستگاه تقطیر در خلأ و یا فریز درایر تا حد خشک شدن تغلیظ شدند.

### روش Ellman برای بررسی فعالیت مهارکنندگی آنزیم

#### استیل کولین استراز

ابتدا غلظت 3 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از هر یک از عصاره‌ها در متانول، آب یا مخلوط آب: متانول تهیه شد. آزمون در پلیت‌های 96 خانه انجام گرفت. به منظور انجام آزمایش مقدار 125 میکرولیتر محلول 0/003 DTNB مولار درون تمامی

از آنجا که روش Ellman یکی از روش‌های عمومی در تعیین توانایی ترکیبات در مهار آنزیم استیل کولین استراز می‌باشد که از دقت بالایی نیز برخوردار است لذا در این تحقیق به منظور دستیابی به گیاهانی با اثرات مهار آنزیم استیل کولین استراز از روش فوق برای بررسی فعالیت شش گونه گیاهی از جنس *Ferula* که سرشار از ترکیبات کومارینی می‌باشند، استفاده شده است. در مطالعات مختلف دوزهای شروعی متفاوتی را برای آزمودن اثر AChEI عصاره‌های گیاهی با روش Ellman در نظر گرفته‌اند (1000 - 100 میکروگرم بر میلی‌لیتر) و عصاره‌هایی با  $IC_{50}$  کمتر از 100 میکروگرم بر میلی‌لیتر را دارای اثرات قوی، 200 - 100 میکروگرم بر میلی‌لیتر را دارای اثرات متوسط و بیشتر از 200 میکروگرم بر میلی‌لیتر را دارای اثرات ضعیف مهار آنزیم دانسته‌اند [11-13]. در این تحقیق به علت حلالیت کم عصاره‌ها در غلظت‌های بالا و نیز فاقد ارزش بودن اثرات مهاری عصاره‌ها در غلظت‌های زیاد، عصاره گیاهان مورد نظر در غلظت 300 میکروگرم بر میلی‌لیتر مورد بررسی قرار گرفته‌اند.

### مواد و روش‌ها

**جمع‌آوری گیاهان:** اندام هوایی تعدادی از گیاهان متعلق به جنس *Ferula* شامل *F. hezarlalezarica* Y. Ajani از کوه هزار کرمان، *F. ovina* (Boiss.) Boiss. از منطقه راز خراسان شمالی، *F. oopoda* (Boiss. & Buhse Boiss.) از استان گلستان، *F. hirtella* Boiss. از اتوبان تهران - قم، *F. szowitsiana* DC. از 26 کیلومتری سمنان از سمت دامغان و *F. persica* Willd. var. *persica* از دوراهی دیزین جمع‌آوری شدند. نمونه هرباریومی هر یک از گیاهان تهیه و پس از تعیین نام علمی در هرباریوم مرکز تحقیقات طب سنتی و مفردات پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی نگهداری شدند. شماره هرباریومی گیاهان مذکور به ترتیب 2922، 3021، 970، 2548 و 3036 بوده و گیاه *F. hirtella*

هر نمونه به عنوان کنترل منفی و از ماده دونپزیل به عنوان کنترل مثبت استفاده شده است.

## نتایج

نتایج نشان دادند که میزان  $IC_{50}$  ماده استاندارد دونپزیل 0/015 میکروگرم بر میلی لیتر بوده است. میزان مهار آنزیم استیل کولین استراز گونه‌های مورد بررسی از جنس *Ferula* در جدول شماره 1 نشان داده شده است.

همان‌گونه که مشاهده می‌شود فراکسیون کلروفومی گیاه *F. persica var. persica* دارای بیشترین فعالیت مهار آنزیمی به میزان 27/3 درصد در غلظت 300 میکروگرم بر میلی لیتر بوده است. میزان فعالیت آنزیم در حضور و عدم حضور فراکسیون کلروفومی گیاه در نمودار شماره 1 آورده شده است.

چاهک‌ها ریخته شد و بعد از آن به ترتیب 25 میکرولیتر ماده 0/015 ATCI مولار، 50 میکرولیتر بافر فسفات با pH معادل 8 و 25 میکرولیتر نمونه اضافه شد. پلیت در داخل دستگاه میکروپلیت ریدر قرار گرفت و مقدار جذب هر یک از چاهک‌ها در فواصل 13 ثانیه به مدت 65 ثانیه در طول موج 405 نانومتر اندازه‌گیری شد. این مرحله در عدم حضور آنزیم انجام گرفت و به منظور بررسی تخریب غیر آنزیماتیک سوبسترا می‌باشد. بعد از این مرحله به تمامی چاهک‌ها مقدار 25 میکرولیتر آنزیم 0/22 واحدی اضافه شد و میکروپلیت داخل دستگاه قرار گرفت و میزان جذب چاهک‌ها در فواصل 13 ثانیه تا 104 ثانیه اندازه‌گیری شد. در نهایت منحنی میزان جذب در برابر زمان رسم شد و شیب خط به دست آمده که بیانگر میزان فعالیت آنزیم می‌باشد، محاسبه شد. میزان مهار آنزیم توسط هر نمونه از مقایسه میزان فعالیت آنزیم در حضور مهارکننده با میزان فعالیت آنزیم در عدم حضور مهارکننده محاسبه شد [11]. لازم به ذکر است که در این آزمون از حلال

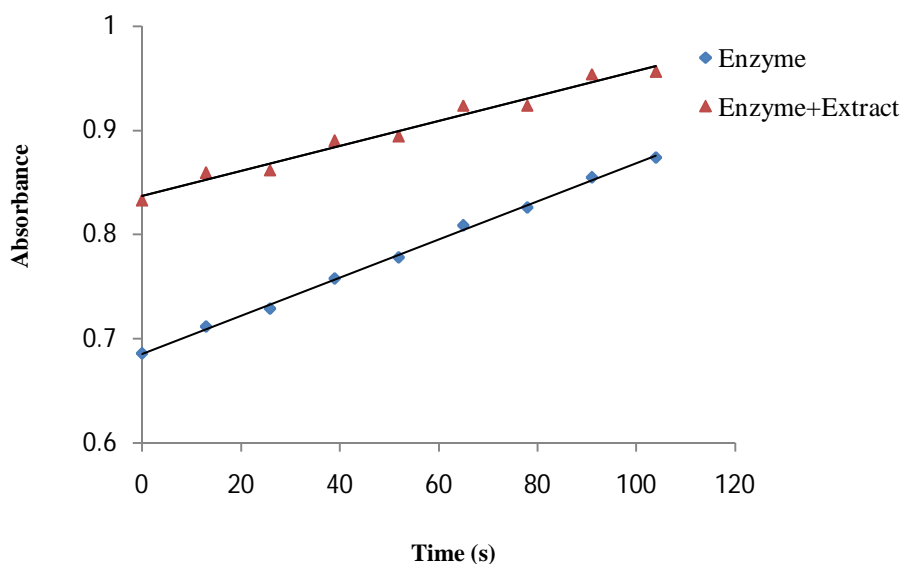
جدول شماره 1- میزان فعالیت مهارکنندگی آنزیم استیل کولین استراز عصاره تام و فراکسیون‌های مختلف برخی گونه‌های جنس *Ferula* در غلظت 300 میکروگرم بر میلی لیتر

نام گیاه	درصد مهار آنزیم						
نوع عصاره	تام	هگزانی	کلروفومی	اتیل استانی	متانولی	متانولی-آبی	آبی
<i>F. hezarlalezarica</i>	11/1±0/4*	**-	17/9±0/1	13/0±0/5	5/4±0/2	2/3±0/3	1/6±0/2
<i>F. persica var. persica</i>	14/1±0/1	-	27/3±0/4	16/7±0/8	9/0±1/4	7/0±0/1	-
<i>F. szowitsiana</i>	12/1±0/3	-	6/2±0/8	7/6±0/2	6/6±0/2	6/8±0/2	3/4±0/5
<i>F. ovina</i>	5/7±0/4	-	-	14/8±0/3	2/0±0/2	-	4/3±0/5
<i>F. oopoda</i>	15/2±0/2	13/4±0/4	10/7±1/6	11/0±0/9	12/4±1/1	2/6±0/5	6/7±0/4
<i>F. hirtella</i>	12/7±0/7	-	1/0±0/0	10/6±1/4	11/9±1/5	4/0±0/0	5/6±0/7

\* اعداد میانگین ± انحراف استاندارد سه نمونه هستند.

\*\* عدم حلالیت نمونه در حلال آب، متانول یا مخلوط آنها





نمودار شماره 1- میزان فعالیت آنزیم استیل کولین استراز در حضور و عدم حضور فراکسیون کلروفومی گیاه *F. persica var. persica*

## بحث

استاتی آن به میزان 16/7 درصد مهار کرده است. دو فراکسیون متانولی و آبی - متانولی گیاه دارای اثرات ناچیز بوده‌اند. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که ترکیباتی با پلاریته کم موجود در فراکسیون کلروفومی و نیز برخی ترکیبات با پلاریته بیشتر موجود در فراکسیون اتیل استاتی عامل مهار آنزیم بوده و مواد پلار گیاه فاقد این اثر می‌باشند. لذا برای استفاده از گیاه در تحقیقات بعدی آلزایمر خالص‌سازی ترکیبات مؤثره الزامی است زیرا با وجودی که عصاره گیاه در مقابل ماده استاندارد دونیزیل با  $IC_{50}$  معادل 0/015 میکروگرم بر میلی‌لیتر مهارکننده بسیار ضعیفی می‌باشد ولی این امکان وجود دارد که گیاه دارای ترکیبی با اثرات قوی مهار آنزیمی ولی در غلظت ناچیز باشد که خود باعث بروز اثرات خفیف مهار آنزیمی عصاره شده است. سایر گیاهان مورد بررسی نیز اثرات ناچیزی روی مهار آنزیم از خود نشان داده‌اند.

پژوهش‌های زیادی جهت یافتن ترکیبات جدید با منشاء گیاهی انجام شده است. فیزوستیگمین و گالانتامین دو ترکیب با ساختار آلکالوئیدی هستند که از گیاهان جدا شده‌اند و اثرات مهارکنندگی آنزیم استیل کولین استراز دارند و امروزه به عنوان

با توجه به روند افزایشی شیوع بیماری آلزایمر در بین سالمندان و مؤثر بودن داروهای مهارکننده آنزیم استیل کولین استراز در بهبود بیماری، یافتن داروهای جدید مهارکننده این آنزیم از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. یکی از دسته گیاهانی که اثرات بیولوژیک فراوانی از آنها گزارش شده است گیاهان جنس *Ferula* هستند [14، 15]. این گیاهان سرشار از ترکیبات سزکویی‌ترین کومارین می‌باشند [4] و از آنجا که اثرات مهارکننده آنزیم استیل کولین استراز برخی از گونه‌های جنس *Ferula* و نیز کومارین‌ها گزارش شده است [8 – 6 و 16]، لذا در این تحقیق اثرات مهارکننده آنزیم استیل کولین استراز برخی گونه‌های جنس *Ferula* رویش یافته در ایران شامل *F. persica var. persica*، *F. oopoda*، *F. szowitziana*، *F. ovina*، *F. hirtella* و *F. hezarlalezarica* بررسی شده است.

نتایج نشان دادند که در میان شش گونه گیاهی مورد بررسی فراکسیون کلروفومی گیاه *F. persica var. persica* دارای قدرت مهار آنزیم به میزان 27/3 درصد در غلظت 300 میکروگرم بر میلی‌لیتر بوده است. این در حالی است که عصاره تام این گیاه آنزیم را به میزان 14/1 درصد و فراکسیون اتیل

با داروی استاندارد دونپزیل باشند ولی دوزهای مؤثر عصاره‌های گیاهی که حاوی ترکیبات مختلف هستند قابل مقایسه با ترکیبات استاندارد نیست.

### نتیجه گیری

با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق، به نظر می‌رسد که ترکیبات نسبتاً غیرقطبی گیاه *F. persica var. persica* دارای اثرات AChEI می‌باشند. نظر به اینکه گیاهان جنس *Ferula* سرشار از ترکیبات سزکویی‌ترین کومارین می‌باشند و بسیاری از اثرات بیولوژیک این گیاهان مانند: سایتوتوکسیسیته، ضد باکتریایی، ضد ویروسی، مهارکنندگی گلیکوپروتئین P و ضد التهابی به این دسته از ترکیبات نسبت داده شده است [5] شاید بتوان این ترکیبات را عامل اصلی اثرات مهاری گیاهان این جنس روی آنزیم AChE دانست ولی اثبات این امر نیاز به خالص‌سازی ترکیبات و بررسی اثرات آنها دارد.

### تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی مصوب در مرکز تحقیقات طب سنتی و مفردات پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهیدبهشتی بوده (شماره 89/ق/125) که بدین وسیله از حمایت‌های مالی آن مرکز تقدیر و تشکر می‌شود. همچنین نویسندگان مقاله مراتب قدردانی خود را از سرکار خانم عاطفه پیرانی به خاطر همکاری در جمع‌آوری و شناسایی گیاهان اعلام می‌دارند.

دارو در درمان آلزایمر به کار می‌روند [17، 18]. در تحقیقی که جهت یافتن ترکیبات غیر آکالوئیدی با منشاء گیاهی و خاصیت مهار آنزیم استیل کولین استراز انجام شد، مشخص گردید که دو ترکیب کومارینی، سه مشتق داکان استری، دو ترکیب فنلی و نیز یک ترکیب پلی استیلنی جدا شده از گیاه *Ferulago campestris* اثرات AChEI دارند [16]. تحقیقی که روی 17 ترکیب کومارینی با اثرات مهارکنندگی آنزیم مونوآمینوآکسیداز A و B انجام شد نشان داد که همه ترکیبات مهارکننده آنزیم AChE نیز می‌باشند. مطالعات کینتیک ثابت کرد که بیشتر این ترکیبات مهارکنندگان غیر رقابتی AChE هستند. این تحقیق پنجره جدیدی را در درمان آلزایمر گشوده است زیرا نتایج حاصل از آن بیان می‌دارد که احتمالاً مهار AChE و MAO، تخریب پروتئین بتا آمیلوئید را کم می‌کند که در بیماری آلزایمر نقش دارد [19]. تحقیق پیازی (Piazz) و همکارانش در سال 2008 منجر به یافتن ترکیبات کومارینی با اثرات قوی مهار دو آنزیم استیل کولین استراز و بوتیریل کولین استراز شد [20]. این تحقیقات اثبات می‌کنند که ترکیباتی با ساختار کومارینی می‌توانند اثرات AChEI داشته باشند. جهت اثبات این امر تحقیقی در سال 2008 در کشور چین انجام شد و آنالوگ‌های مختلف از کومارین‌ها با قرار دادن استخلاف فنیل پیرازین به صورت سنتتیک ساخته شد و اثرات آنها روی آنزیم AChE بررسی شد. نتایج نشان دادند که استخلاف روی موقعیت 3 و 4 باعث ایجاد اثرات مهاری روی آنزیم می‌شود که این اثر قابل مقایسه با داروی ضد آلزایمر دونپزیل می‌باشد [7]. این تحقیق نشان می‌دهد که اثر ترکیبات خالص شده از گیاهان و یا مشتقات آنها می‌توانند قابل مقایسه

### منابع

1. Hajimehdipoor H, Esmaceli S, Ramezani A, Jafari Anaraki M and Mosaddegh M. The cytotoxic effects of *Ferula persica var. persica* and *F. hezarlalehzarica* against HepG-2, A-549, HT-29, MCF-7 and MDBK cell lines. *IJPS*. 2012; 8

(2): 115 - 9.  
2. Tonkaboni SMM. Tohfatomomenin. Translators: Rahimi R, Sham Ardakani MR, Farjadmand F. NashreShahr. Tehran. 2007, pp: 252, 77, 158, 159.



3. Razi AMZ, Alhavi. Vol 1: Central nervous system. Translator: Tabatabaee SM. Alhavi Pharmaceutical Industry. Karaj. 1990, pp: 355, 388.
4. Iranshahi M, Masullo M, Asili A, Hamedzadeh A, Jahanbin B, Festa M, Capasso A and Piacente S. Sesquiterpene coumarins from *Ferula gumosa*. *J. Nat. Prod.* 2010; 73: 1958 - 62.
5. Nazari ZE and Iranshahi M. Biologically active sesquiterpene coumarins from *Ferula* species. *Phytother. Res.* 2011; 25 (3): 315 - 23.
6. Kim DK, Jong PL, Jae HY, Dong OE, Jae SE and Kang HL. Acetylcholinesterase inhibitors from the roots of *Angelica dahurica*. *Arch. Pharm. Res.* 2002; 25 (6): 856 - 9.
7. Zhou X, Wang XB, Wang T and Kong LY. Design, synthesis and acetylcholinesterase inhibitory activity of novel coumarin analogues. *Bioorg. Med. Chem.* 2008; 16 (17): 8011 - 21.
8. Phoopichayanun C, Phuwapraisirisan P, Tip-Pyang S and Jongaramruong J. Complete NMR assignment and absolute configuration of feronielloside, a new acetylcholinesterase inhibitor from *Feroniella lucida*. *Nat. Prod. Res.* 2008; 22 (15): 1297 - 303.
9. Tabet N. Acetylcholinesterase inhibitors for alzheimer's disease: anti-inflammatories in acetylcholine clothing. *Age Ageing.* 2006; 35 (4): 336 - 8.
10. Ellman GL, Courtney KD, Andres V and Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase inhibitor activity. *Biochem. Pharmacol.* 1961; 7: 88 - 95.
11. Mukhejee PK, Kumar V and Houghton PJ. Screening of Indian Medicinal Plants for Acetylcholinesterase Inhibitory Activity. *Phytother. Res.* 2007; 21: 1142 - 5.
12. Adhami HR, Farsam H and Krenn L. Screening of medicinal plants from Iranian Traditional Medicine for acetylcholinesterase inhibition. *Phytother. Res.* 2011; online.
13. Lin HQ, Ho MT, Lau LS, Wong KK, Shaw PC and Wan DC. Anti-acetylcholinesterase activities of Traditional Chinese Medicine for treating Alzheimer's disease. *Chemico-Biol. Inter.* 2008; 175: 352 - 4.
14. Vijayalakshmi, Bhat P, Chaturvedi A, Bairy KL and Kamath S. Evaluation of the effect of *Ferula asafoetida* Linn. gum extract on learning and memory in wistar rats. *Indian J. Pharmacol.* 2012; 44 (1): 82 - 7.
15. Hanafi EM, Raouf AA, Kassem SS, Abdel-Kader MM and Elkadrawy HH. A novel herbal remedy to alleviate drawbacks of heat stress in rats with special references to some reproductive and molecular alterations. *Global J. Biotechnol. Biochem.* 2010; 5 (3): 145 - 52.
16. Stefano DA, Filippo M, Paola M, Marina S, Fabrizio P, Sauro V and Gabbriella I. Identification of non-alkaloid acetylcholinesterase inhibitors from *Ferulago campestris* (Besser) Grecescu (Apiaceae). *Fitotrapia* 2010; 81 (8): 1208 - 12.
17. Olin J and Schneider L. Galantamine for dementia due to Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2002; (3): CD001747.
18. Beri V and Gupta R. Acetylcholinesterase inhibitors neostigmine and physostigmine inhibit induction of alpha-amylase activity during seed germination in barley, *Hordeum vulgare* var. *Jyoti*. *Life Sci.* 2007; 80 (24 - 25): 2386 - 8.
19. Bruhlmann C, Ooms F, Carrupt PA, Testa B, Catto M and Leonetti F. Coumarins derivatives as dual inhibitors of acetylcholinesterase and monoamine oxidase. *J. Med. Chem.* 2001; 44 (19): 3195 - 8.
20. Piazzini L, Cavalli A, Colizzi F, Belluti F, Bartolini M, Mancini F, Recanatini M, Andrisano V and Rampa A. Multi-target-directed coumarin derivatives: hAChE and BACE1 inhibitors as potential anti-alzheimer compounds. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2008; 18 (1): 423 - 6.