Downloaded from jmp.ir at 22:26 +0330 on Tuesday September 28th 2021

آلکالوئید تریگونلین، یک متابولیت دارویی ارزشمند گیاهی

علی مهرآفرین[۱]، نسرین قوامی[۲]، حسنعلی نقدی‌بادی[۳]*، اردشیر قادری[٤]

۱- عضو هیأت علمی، گروه پژوهشی کشت و توسعه، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی، کرج
۲- دانشجوی دکتری تخصصی باغبانی، گروه پژوهشی کشت و توسعه، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی، کرج
۳- دانشیار پژوهش، گروه پژوهشی کشت و توسعه، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی، کرج
٤- عضو هیأت علمی، گروه پژوهشی بیوتکنولوژی گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی، کرج
*آدرس مکاتبه: ایران، کرج، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی، صندوق‌پستی: ۳٦۹ – ۳۱۳۷۵
تلفن: ۳٤۷٦٤۰۱۰ (۰۲٦)، نمابر: ۳٤۷٦٤۰۲۱ (۰۲٦)
پست الکترونیک: Naghdibadi@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۸۹/۱۲/۲۰ **تاریخ تصویب:** ۹۰/۹/۲

چکیده

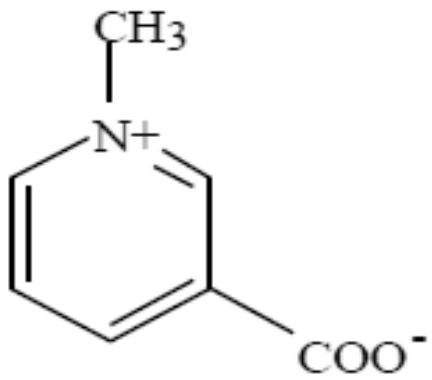
تریگونلین یک ترکیب آلکالوئیدی است که دارای نقش هورمونی در گیاهان می‌باشد. این متابولیت از طریق متیلاسیون اسید نیکوتنیک در گیاه ساخته می‌شود و در بسیاری از گونه‌های گیاهی از جمله قهوه، شنبلیله، سویا، نخود، یونجه و غیره شناسایی شده است. این آلکالوئید دارای خواص دارویی مهمی نظیر ضدسرطان، ضدمیگرن، ضدعفونی‌کنندگی، پایین‌آورندگی چربی خون و ضددیابت می‌باشد. چندین مطالعه نشان داده است که تریگونلین با اثر بازدارندگی بر فعالیت آنزیم‌های اصلی متابولیسم گلوکز، باعث کاهش سطح گلوکز خون می‌شود. بر این اساس متابولیت تریگونلین می‌تواند موجب تولید دارویی جدید برای کنترل و درمان دیابت شود. تریگونلین در مکانیسم بسته‌شدن برگ‌ها در شب برای برخی از گیاهان (شب خسب)، در پاسخ به تنش‌های اکسیداتیو، تنظیم فشار اسمزی در واکنش به تنش شوری و خشکی، تنظیم توقف چرخه سلولی گیاه در مرحله G_2 و بیان ژن‌های محرک تولید گره در ریشه لگوم‌ها طی فرآیند کلون‌سازی نقش بسیار مهمی را ایفا می‌کند.

گل‌واژگان: اسید نیکوتنیک، تریگونلین، خواص درمانی، دیابت، متابولیسم گیاهی

Downloaded from jmp.ir at 22:26 +0330 on Tuesday September 28th 2021

مقدمه

امروزه آلکالوئید دارویی تریگونلین درتعداد زیادی از گیاهان شناسایی شده و در بعضی از خانواده‌های گیاهی مانند Lamiaceae، Asteraceae، Fabaceae و به ویژه در دانه‌های گونه‌های گیاهی جنس قهوه (*Caffea* sp.) به مقدار زیادی یافت می‌شود [۱]. تریگونلین دارای فرمول شیمیایی $C_7H_7NO_2$ (شکل شماره ۱)، وزن مولکولی ۱۳۷/۱٤، در آب محلول و نقطه ذوب ۲۱۸ درجه سانتی‌گراد می‌باشد [۲]. تریگونلین برای نخستین بار از گیاه شنبلیله (*Trigonella foenum-graceum*) استخراج شد و تاکنون در گیاهان مختلف و چندین گونه حیوانی نظیر توتیا (خار دریایی) و ستاره دریایی و نیز در ادرار پستانداران بعد از استفاده از اسید نیکوتنیک مشاهده شده است [۳].



شکل شماره ۱- ساختار شیمیایی تریگونلین

با مصرف مواد خوراکی حاوی تریگونلین، این ماده وارد بدن انسان می‌شود. در یک بررسی بر روی زنان مورد آزمایش بعد از مصرف ۵۰ میلی‌گرم (۰/۳٦ میلی‌مول) تریگونلین خوراکی، ۲۱ - ۲۰ درصد آن به صورت تریگونلین و ۱۰ - ۹ درصد به شکل اسید ان - متیل - پیریدون - ۵ - کربوکسیلیک (*N'*-methyl-2-pyridone-5-carboxylic acid) در ادرار آنها مشاهده شد [۳،٤].

مواد خوراکی متعددی حاوی تریگونلین می‌باشند که قهوه، جو، طالبی، ذرت، پیاز، نخود، سویا، گوجه فرنگی و غیره از آن جمله می‌باشند [۲]. در قهوه فرآوری شده مقدار تریگونلین تا ۱ درصد می‌رسد [۵] و متوسط مقدار تریگونلین در یک فنجان قهوه ۵۳ میلی‌گرم است [۲،٦].

متابولیت تریگونلین در طی چرخه بیوسنتز نوکلئوتید پیریدین از نیکوتینات، که از مشتقات نوکلئوتیدهای پیریدینی است، ساخته می‌شود. همچنین تریگونلین از نیاسین (ویتامین B_3) ساخته می‌شود و حدود ۵ درصد از نیاسین خوراکی به تریگونلین تبدیل می‌شود [۳]. بنابراین با مصرف ۱۵ میلی‌گرم (مقدار مجاز مصرف روزانه) نیاسین، حدود ۰/۷۵ میلی‌گرم تریگونلین تولید می‌شود. لازم به ذکر است، اگرچه نیاسیتین (Niacytin) یک ترکیب فرعی نیاسین در غلات می‌باشد ولی تبدیل به تریگونلین نمی‌شود [۷]. گیاه شنبلیله [۸]،خربزه‌زمستانی (Tung-kua-jen)(*Benincasa hispida*) [۹]، استروفانتوس (*Strophantus kombe*) و چشم خروس (*Abrus precatorius*) دارای تریگونلین هستند و برخی از آنها به طور گسترده‌ای به عنوان فرآورده‌های ضددیابت مورد استفاده قرار می‌گیرند. همچنین مواد خوراکی حاوی شنبلیله نیز مانند ادویه‌ها منبع دیگری از تریگونلین محسوب می‌شوند [۲]. در جدول شماره ۱ تعدادی از گیاهان دارای تریگونلین ذکر شده‌اند.

نام‌های شیمیایی تریگونلین

پیریدینیوم ۳- کربوکسی- ۱- متیل، پیریدینیوم ۳- کربوکسی- ۱- متیل هیدروکساید (Pyridinium 3-Carboxy-1-methyl hydroxide)، نیکوتینات بتائین (Betaine nicotinate)، کافرین (Caffearine)، ۳ - کربوکسی- ۱- متیل‌پیریدینیوم بتائین (3-Carboxy-1-methylpyridinium betaine)، ۳- کربوکسی- ۱- متیل

Downloaded from jmp.ir at 22:26 +0330 on Tuesday September 28th 2021

جدول شماره ۱ – گیاهان دارای تریگونلین [۲]

نام	نام علمی	اندام گیاه	مقدار (ppm)
جو	*Hordeum vulgare*	بذر	۹
طالبی	*Cucumis melo*	بذر	۶–۲
قهوه	*Coffea arabica*	بذر	۱۳۰۰۰–۳۰۰۰
		لپه	۱۳۰۰۰–۶۰۰۰
	C. canephora var. *robusta*	لپه	۱۱۰۰۰–۳۰۰۰
	C. liberica	لپه	۲۹۰۰–۲۴۰۰
ذرت	*Zea mays*	بذر	۴
شنبلیله	*Trigonella foenumgraecum*	بذر	۱۳۰۰
پیاز	*Allium cepa*	بذر	۱۳
نخود فرنگی	*Pisum sativum*	بذر	۲۲۷–۱۲۸
		میوه	۲۰۳–۶
		گیاهچه	۹۱
		برگ	۸۸–۹
		ریشه	۷۵–۱
		اندام هوایی	۵۵
		ساقه	۲۴–۱
سویا	*Glycine max*	بذر	۷۱/۸–۱۹/۷
		برگ	۶۳/۲–۱۰/۵
		میوه	۱۶/۲–۳/۷
		ساقه	۷/۶–۱/۵
		ریشه	۱/۱
گوجه فرنگی	*Lycopersicon esculentum*	ریشه	۶۹
خربزه زمستانی	*Benincasa hispida*	میوه	*
کَبر	*Capparis humilis*	میوه	*
بنگ دانه (ماری‌جواانا)	*Cannabis sativa*	برگ	*

* در این گیاهان تریگونلین وجود دارد اما هنوز مقدار دقیق آن تعیین نشده است.

پیریدینیوم هیدروکساید، ۳- کربوکسی ـ ۱- متیل پیریدینیوم، کوفرین (Coffearine)، جین‌سین (Gynesine)، جین‌سیس (Gynesis)، ان- متیل‌نیکوتینات، اسید ان- متیل‌نیکوتینات (*N'*-Methylnicotinic acid)، اسید ان- متیل‌نیکوتینات بتائین، ان- متیل اسید نیکوتینیک، ان- متیل بتایین اسید نیکوتینیک (*Nicotinic acid N*-methylbetaine)، تریگونلین [۲].

پراکنش زیست- محیطی

تریگونلین دارای پراکنش زیادی در زیرتیره گیاهان دولپه می‌باشد و در بذرهای خشک بعضی گیاهان فوق راسته (یک طبقه در رده‌بندی که بین راسته و رده یا زیر رده قرار دارد.) Araliiflorae، Caryophylliflorae، Corniflorae، Fabiflorae، Gentianiflorae، Lamiiflorae، Loasiflorae، Magnoliflorae، Malviflorae، Myrtiflorae، Polygoniflorae،

Downloaded from jmp.ir at 22:26 +0330 on Tuesday September 28th 2021

Primuliflorae، Ranunculiflorae، Rosiflorae، Rutiflorae، Santaliflorae، Solaniflorae، Violiflorae وجـــــود دارد [۲]. تریگونلین همچنین در ستاره دریـایی، خـار دریـایی (توتیـا)، عضله سخت‌پوستان (خانواده خرچنگ) [۱۰]، صدف خـوراکی و اسفنج دریایی [۱۱] مشاهده شده است. همچنین در بندپایان، خزه‌زیان، طناب‌داران، تیره نخ کیسه‌داران (دسته‌ای از مرجان‌ها) و نرم‌تنان نیز وجود دارد [۱۱]. تریگونلین در اندام‌های مختلف بعضی از انواع ماهی‌ها مانند مـاهی کـولی ژاپنـی، شـاه مـاهی اقیانوس و ساردین‌های حقیقی [٦] و نیز در پستانداران وجـود دارد [۱۱].

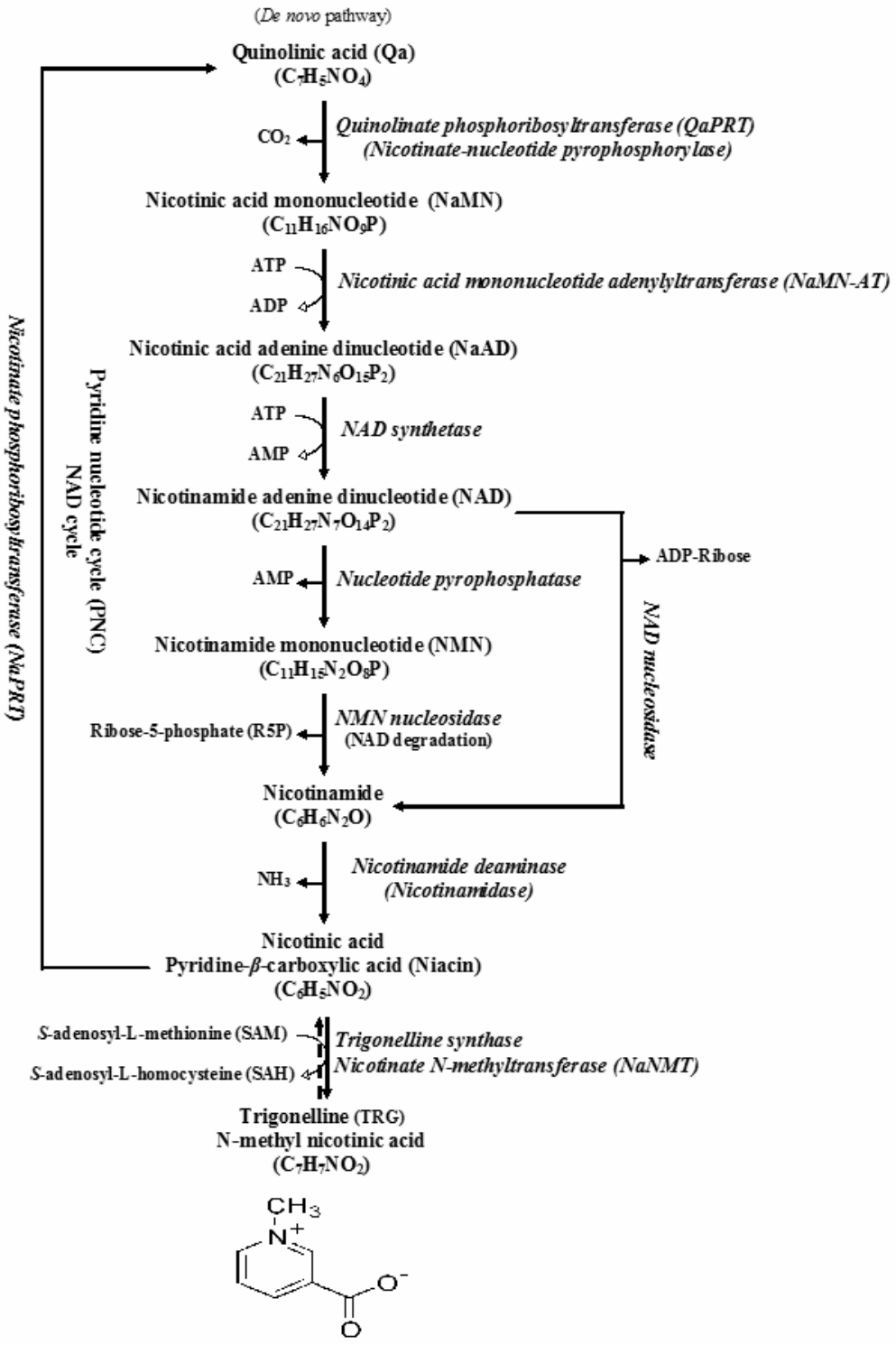
قابلیت جهـش‌زایـی ژنتیکـی تریگـونلین در سیـستم‌هـای پروکاریوتیک و یوکاریوتیک

در سیستم‌های پروکاریوتیکی بررسی‌ها نـشان داده اسـت کـه تریگونلین تـا غلظـت‌هـای حـدود ۱۰۰۰۰ میکروگـرم بـر پلیـت (Plate) (۷۳ میکرومـول بـر پلیـت) در سـویه‌هـای TA1535، TA1537، TA1538، TA98 و TA100 باکتری *Salmonella typhimurium*، قابلیـت جهـش‌زایـی نـدارد [۱۲]. در آزمایـشی دیگر، مشخص شد که ۱۰۰۰ میکرومول از تریگـونلین بـه دسـت آمده (مشابه با شـرایط برشـته‌کـردن قهـوه) در دمـای ۲۵۰ درجـه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه، باعث جهـش‌زایـی در نـژاد TA98 باکتری *S. typhimurium* می‌شود. همچنین وقتـی تریگـونلین در ترکیب با مخلوطی از اسیدهای آمینه (آلانـین، آرژنـین، سیـستئین، لیزین، فنیل‌آلانین، پرولین، سرین، ترئونین و والـین) و گلـوکز، بـه مدت ۲۰ دقیقه در معـرض دمـای ۲۵۰ درجـه سـانتی‌گـراد قـرار می‌گیرد، مواد حاصل از این برهم کنش می‌تواند باعث جهش‌زایی در سـویه‌هـای TA98 و YG1024 بـاکتری *Salmonella typhimurium* شود اما در دیگر سویه ایـن بـاکتری (YG1029) و در حضور فعالیت متابولیکی آن قابلیـت جهـش‌زایـی ندارنـد [۱۳]. در مطالعـه بـر روی سیـستم‌هـای یوکـاریوتیکی ماننـد سلول‌های $L5178Y\ TK^{+/-}$ بافت لنفاوی موش، تریگونلین اثر جهش‌زایی در مقادیر کمتر از ۷٤۰۰ میکروگـرم بـر پلیـت (٥٤ میکرومول بر پلیت) نداشته است [۱۲].

بیوسنتز تریگونلین

اسید نیکوتنیک، پیش ماده اصلی و اولیه بیوسنتز تریگونلین در گیاهان است و از سوی دیگر خود محصول تجزیه نیکـوتین‌آمیـد آدنین دی‌نوکلوتید (NAD) می‌باشد [١٤]. تریگونلین توسط آنزیم اس – آدنوزیـل ـ ال ـ متیـونین (*S*-adenosyl-L-methionine (SAM)) متعلق به ان‌ـ متیل‌ترانـسفراز نیکوتینـات (Nicotinate Nmethyltransferase) ساخته می‌شود [۱۵] (شـکل شـماره ۲). این آنزیم از سلول‌هـای کـشت شـده سـویا (*Glycine max*) [١٦] و عدسـک آبـی (*Lemna paucicostata*) در محـیط کشت [۱۷] استخراج شده است. اگـر چـه در گیـاه قهـوه نیـز ان ـ متیل ترانسفراز نیکوتینات (تریگـونلین سـنتتاز) در محـیط کشت عاری از سلول، به دست آمده اما هنـوز مطالعـه‌ای روی خالص‌سازی آن انجام نشده است [۱۸]. تاکنون ژن تریگـونلین سنتتاز از هـیچ موجـود زنـده‌ای تـوالی‌یـابی و همـسانه‌سـازی (Cloning) نشده است. تریگونلین می‌تواند در گیاه طـی یـک واکنش برگشتی به اسید نیکوتنیک دمتیله شده و برای سـاخت NAD به کار رود (شکل شماره ۲). این عمل در عصاره بـرگ بعضی از گیاهان نظیر نخود فرنگی دیده شـده اسـت [۱۹]. بـا وجود این که تریگـونلین در پریکـارپ بیـشتر از بـذر سـاخته می‌شود اما مقدار آن در بذر فراوان‌تر است که نـشان مـی‌دهـد مقداری از تریگونلین ساخته شده در پریکارپ بـه بـذر منتقـل می‌شود. اما در هنگام جوانه‌زنی بـه دلیـل مـصرف تریگـونلین مقدار آن در بذر کاهش می‌یابد [١٤]. شیمیزو و مزافرا [۱۹] در تحقیقی، تغییر در مقـدار تریگـونلین بـذر قهـوه را در مراحـل ابتدایی جوانه‌زنی بررسی کردند و نتیجـه گرفتنـد کـه در طـی

Downloaded from jmp.ir at 22:26 +0330 on Tuesday September 28th 2021



شکل شماره ۲- مسیر احتمالی بیوسنتز تریگونلین و نوکلئوتیدهای پیریدینی [۲۳،۲۴،۲۵،۲۶،۲۷،۳۰].

Downloaded from jmp.ir at 22:26 +0330 on Tuesday September 28th 2021

جوانه‌زنی، تریگونلین انباشته شده در بذرها به اسید نیکوتینیک تبدیل شده و برای ساخت NAD استفاده می‌شود. بنابراین، تریگونلین به عنوان مخزن اسید نیکوتنیک در گیاهان عمل می‌کند. بخشی از اسید نیکوتنیک تشکیل شده از تریگونلین در طی مراحل برگشتی بعدی تبدیل به دیگر متابولیت‌ها می‌شود. ویلک و همکاران [۲۰] بیان کردند که واکنش برگشتی اسید نیکوتنیک در کشت سلولی می‌تواند فقط در اسید نیکوتنیک‌هایی که دارای واحدهای قندی می‌باشند، مشاهده گردد که البته این واکنش شامل اسید ٦-هیدروکسی‌نیکوتنیک نمی‌شود. از سوی دیگر هنوز مسیر برگشتی حلقه پیریدین تریگونلین در گیاهان به طور کامل مشخص نیست [۲۱].

تغییرات تریگونلین در طی جوانه‌زنی بذر

تجمع تریگونلین در بذر بعضی از گیاهان خانواده لگوم نظیر شبدر، شنبلیله، یونجه و ماش دیده شده است. در گیاهچه‌های ماش، مانند بیشتر گیاهان، NAD از هر دو مسیر *De novo* و Salvage سنتز می‌شود (شکل شماره ۲) [۲۲]. اگر چه در حیوانات نیکوتین آمید، توسط آنزیم نیکوتین آمیدفسفوریبوزیل ترانسفراز دوباره ساخته می‌شود [۲۳]، اما در گیاهچه‌های ماش ابتدا این ماده توسط نیکوتین آمیداز به اسید نیکوتنیک تبدیل شده و سپس اسید نیکوتنیک توسط نیکوتین آمیدفسفوریبوزیل ترانسفراز ساخته می‌شود. بررسی تغییرات تریگونلین در گیاه ماش نشان داده است که همانند برگ‌ها و میوه‌های قهوه [١٤]، چرخه ٦ جزیی نوکلئوتید پیریدین در لپه‌ها و محور جنینی بذرهای در حال جوانه‌زنی گیاه فعال است. اما در این گیاه یک آنزیم دیگر که واکنش تبدیل منونوکلئوتید نیکوتین آمید را به نیکوتین آمید ریبوزاید تسریع می‌کند نیز، وجود دارد. بنابراین در گیاهچه‌های ماش چرخه ۷ جزیی نوکلئوتید پیریدین عمل می‌کند. عملکرد این آنزیم‌ها با بلوغ لپه‌ها کاهش می‌یابد اما نیکوتین آمید موجود در لپه‌ها طی جوانه‌زنی اهمیت دارد. نتایج این تحقیق نشان داد که فعالیت آنزیم تریگونلین سنتاز در محور جنینی افزایش و در لپه‌ها کاهش می‌یابد. در نتیجه تریگونلین لپه‌ها به محور جنینی منتقل و مانند دیگر ترکیبات در طی جوانه‌زنی ذخیره می‌شود. بنابراین تریگونلین به عنوان شکل ذخیره‌ای اسید نیکوتنیک حداقل در طی جوانه‌زنی عمل می‌کند. تریگونلین اثری روی رشد گیاهچه‌ها ندارد اما اسید نیکوتنیک و نیکوتین آمید بازدارندگی مهمی روی رشد ریشه دارند. بنابراین یکی از دلایل سنتز تریگونلین در گیاهچه‌های ماش، کاهش مقدار زیاد اسید نیکوتنیک و نیکوتین آمیدی است که از چرخه NAD در سلول‌ها رها شده است [٢٤]. نتایج یک تحقیق دیگر نشان داد که تریگونلین در اثر گرما به نیاسین تبدیل می‌شود و مقادیر بالای آن در محور و لپه‌های گیاهچه می‌تواند در جوانه‌های سویا و لوپن منبع خوبی از نیاسین بسازد که در جلوگیری یا درمان بیماری پلاگر موثر می‌باشد. جوانه‌زنی تحت تأثیر مقدار تریگونلین قرار گرفته و تغییرات جزیی مشاهده می‌شود. بالاترین میزان تریگونلین در طی روزهای آغازی بعد از جوانه‌زنی مشاهده شده است. تریگونلین می‌تواند کیفیت غذایی جوانه‌های سویا و لوپن را بهبود دهد [۲۵].

خواص درمانی

تریگونلین یک هورمون گیاهی است که دارای خواص درمانی متعددی از قبیل، ضدسرطان (دهانه رحم و کبد)، ضدمیگرن، ضدعفونی‌کننده، ضدچربی خون بالا و دیابت می‌باشد [۱،۲]. بررسی اثر تریگونلین بر روی موش‌ها نشان می‌دهد که این ماده به عنوان آرام‌بخش عمل می‌کند [٢٦]. به هر حال تریگونلین متابولیتی حاصل از نیاسین [۳] می‌باشد، که یکی از ویتامین‌های مکمل‌های غذایی و دارویی می‌باشد و به طور کلی به عنوان پایین آورنده چربی و قند خون مصرف می‌شود. نیاسین به فرم قرص تولید شده و به میزان ۲-۱

Downloaded from jmp.ir at 22:26 +0330 on Tuesday September 28th 2021

گرم، ۳-۲ بار در روز استفاده می‌شود [۲]. براساس مطالعات بافت زنده حیوانی، تریگونلین در انسان به عنوان یک ناقل موثر دارو به مغز (مانند فنیل‌اتیل‌آمین (Phenylethylamine) [۲٦]، دوپامین (Dopamine) [۲]، ۲،۳ دی‌داکسی‌نوکلئوزید (2,3-dideoxynucleosides) [۲۷] و فنیتوین (Phenytoin) [۲۸]) و به پوست (مانند اسیکلوویر (Acyclovir) [۲۹]) می‌باشد. به طور خلاصه در ذیل خواص درمانی متابولیت تریگونلین به تفکیک اثر بررسی شده است.

اثر ضددیابت

به طور کلی آنزیم گلوکز ٦ـ فسفاتاز در کبد، گلوکز ٦ فسفات را تجزیه کرده که در نتیجه یک گروه فسفات و یک گلوکز آزاد تولید و سپس گلوکز توسط پروتئین‌های غشایی ناقل گلوکز از سلول خارج می‌شود [۳۰]. این واکنش، مرحله نهایی در گلوکونئوژنزیز (Gluconeogenesis) (تشکیل قند از مواد غیرقندی) و گلیکوژنولیزیز (Glycogenolysis) (تنظیم غلظت قند خون از طریق تبدیل مجدد گلیکوژن به گلوکز) را کامل می‌کند و نقش کلیدی در تنظیم تعادل سطح گلوکز خون بازی می‌کند. اما در بیماران دیابتی فعالیت این آنزیم در کبد تا دو برابر افزایش می‌یابد. مطالعات حیوانی در زمینه اثر تریگونلین بر سطح گلوکز خون، نتایج بسیار ارزشمندی را نشان می‌دهد. در یک تحقیق اثرضد دیابتی آلکالوییدهای گیاه چشم خروس که دارای مقدار زیادی تریگونلین است بر روی خرگوش‌های دیابتی شده با آلوکسان (Alloxan) (دارویی که باعث تخریب گزینشی سلول‌های بتای لوزالمعده و در نتیجه پیدایش دیابت تجربی می‌شود) مطالعه شده است. برای این منظور، سه گروه خرگوش دیابتی بعد از تزریق آلوکسان انتخاب شدند. برای درمان دیابت در گروه اول از داروی کلروپروپامید (Chlorpropamide) و در گروه دوم از تریگونلین استفاده شد و گروه سوم هیچ دارویی دریافت نکردند. نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که استفاده از تریگونلین و داروی کلروپروپامید به مقدار ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت خوراکی، باعث کاهش سطح قند خون خرگوش‌ها شد. بیشترین درصد کاهش گلوکز خون بعد از ۲۰ و ۳۰ ساعت به ترتیب در گروه‌های دریافت‌کننده داروی کلروپروپامید و تریگونلین به دست آمد. اثر تریگونلین گیاه چشم خروس بر کاهش قند خون از طریق بازدارندگی بر فعالیت آنزیم گلوکز ٦ـ فسفاتاز و گلیکوژن فسفوریلاز بوده است. تریگونلین باعث افزایش گیرنده‌های انسولین در گلبول‌های قرمز خون شده و جذب گلوکز را در بافت‌های بدن بهبود می‌بخشد. نظر به این که لوزالمعده توسط آلوکسان تخریب شده است بنابراین تریگونلین توانسته است میزان گلوکز خون را از طریق مکانیسم خارج از لوزالمعده (Extrapancreatic) کاهش دهد. کاهش سطح گلوکز و اثر بازدارندگی بر روی دو آنزیم عمده متابولیسم گلوکز توسط تریگونلین، می‌تواند نویدبخش تولید دارویی جدید برای درمان دیابت باشد [۳۱].

در تحقیقی دیگر استفاده از تریگونلین و اسید نیکوتینیک در موش‌های غیرچاق مبتلا به دیابت نوع II، باعث بهبود تحمل گلوکز شده است. در این تحقیق سطح خونی انسولین موش‌ها، ۱۵ دقیقه بعد از تجویز خوراکی با تریگونلین افزایش و به تدریج تا دو ساعت بعد کاهش یافت. اما در مقابل آن برای موش‌های شاهدی که تریگونلین دریافت نکردند، سطح انسولین به تدریج بعد از دو ساعت افزایش یافت که نشان می‌دهد تریگونلین می‌تواند باعث بهبود مقاومت به انسولین شود. سطح تری‌گلیسرید سرم و کبد نیز در موش‌هایی که تریگونلین و اسید نیکوتینیک دریافت کردند، پایین‌تر از موش‌های شاهد بود. همچنین در موش‌های دریافت‌کننده تریگونلین و اسید نیکوتینیک، فعالیت برخی از آنزیم‌های کبدی کمتر و فعالیت بیشتر آنزیم کارنیتین پالمیتیل ترانسفراز

Downloaded from jmp.ir at 22:26 +0330 on Tuesday September 28th 2021

(Carnitine palmitoyl transferase) کبد و گلوکوکیناز (Glucokinase) مشاهده شد و به نظر می‌رسد که تنظیم فعالیت این آنزیم‌ها توسط تریگونلین و اسید نیکوتنیک رابطه نزدیکی با جلوگیری از مهار تری‌گلیسرید و پیشرفت بیماری دیابت دارد [۳۲].

در چندین آزمایش انجام شده درباره سنجش اثر تریگونلین بر سطح گلوکز خون در انسان مشخص شد که مصرف تریگونلین به طور قابل توجهی سطح گلوکز و انسولین را ۱۵ دقیقه بعد از تست تحمل گلوکز در مقایسه با دارونما کاهش داد. نتایج این تحقیقات نشان دادند که تریگونلین پاسخ اولیه سطوح گلوکز و انسولین را در تست تحمل گلوکز کاهش می‌دهد [۳۳]. اما در تحقیقی دیگر، به موش‌های بزرگ آزمایشگاهی دیابت شده توسط آلوکسان (Alloxan-induced diabetes)، تریگونلین با دوز ۲۵۰ تا ۱۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم از راه خوراکی داده شد و مشخص شد که تریگونلین اثر ملایم و زودگذری را بر آنها دارد [۳٤].

اثر ضدسرطان

اثر تریگونلین روی تکثیر و تهاجم سلول‌های سرطانی در کشت بافت لاین AH109A سلول‌های سرطانی کبد موش نشان داد که نیاسین و تریگونلین در غلظت‌های ٤۰ – ۲/۵ میکروگرم، مانع تهاجم سلول‌های سرطانی کبد شده اما بر تکثیر سلول‌ها تأثیری ندارند [۳۵].

اثر ضدمیکروبی

تریگونلین خواص ضدمیکروبی در مقابل باکتری‌های گرم مثبت دارد و در غذاها می‌توان از آن به عنوان نگهدارنده طبیعی برای کنترل و مهار رشد باکتریایی استفاده کرد [۳٦]. همچنین تریگونلین بازدارنده رشد باکتری *Streptococcus mutans* می‌باشد که عامل ایجاد پوسیدگی دندان در انسان است [۳۷].

استروژن گیاهی (فیتواستروژن)

تریگونلین مانند یک سیگنال و نشانگر زیستی عمل می‌کند، به طوری که عملکرد زیستی آن را می‌توان موردسنجش قرار داد. در هند از این ماده برای درمان مشکلات دوران یائسگی زنان استفاده می‌شود. در یک مطالعه از سلول‌های کشت شده سینه (MCF-7) که حساس به استروژن می‌باشند استفاده شد و اثر این ترکیب بر قابلیت تکثیر این سلول‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که تریگونلین باعث تکثیر سلول‌های MCF-7 شده و حتی در دوزهای پایین در حد ۱۰۰ پیکومول بر لیتر (pmol/L, p=0.03) رشد سلول‌ها بسیار افزایش یافته است. نتایج نشان داد که تریگونلین رشد سلول‌های MCF-7 سینه را از طریق گیرنده استروژنی افزایش می‌دهد و به عنوان یک استروژن طبیعی عمل می‌کند [۳۸].

در تحقیق دیگری، فعالیت استروژنی تریگونلین بر روی موش‌های باردار بررسی شد. در روزهای ۷ – ۱ بارداری مقدار ۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم تریگونلین به موش‌ها داده شد. سپس در روز دهم لاپاراتومی انجام و تعداد جنین‌ها شمارش شد. محل برش بخیه شده و پس از مدتی محل جراحی بهبود یافت. بعد از ۲۱ روز تعداد نوزاد موش‌ها شمارش شد. تفاوت قابل توجهی بین تعداد جنین‌ها و نوزادان در مقایسه با شاهد وجود نداشت که نشان می‌دهد تریگونلین ماده‌ای بی‌ضرر در طی بارداری برای موش‌ها می‌باشد [۳۹].

تأثیر بر اعصاب شنوایی

در یک مطالعه هونگ و همکاران [٤۰] گزارش کردند که تریگونلین قهوه می‌تواند با تغییر آستانه شنوایی و کاهش آسیب اثر بیماری شنوایی- دیابتی، از اختلال شنوایی در بیماران جلوگیری کند. تریگونلین یک ماده بسیار فعال با قدرت باززایی قوی در اعصاب و سیناپس‌ها است. بنابراین به نظر

Downloaded from jmp.ir at 22:26 +0330 on Tuesday September 28th 2021

می‌رسد که تریگونلین ممکن است با بازززایی آکسون‌ها و سیناپس‌ها باعث تعدیل بروز فاکتورهای رشد اعصاب در بیماری اعصاب شنوایی ناشی از محرک پیرودوکسین شود. غلظت بالای پیریدوکسین یا ویتامین B_6 یکی از عوامل ایجاد بیماری اعصاب شنوایی محیطی است. در تحقیقی دیگر روی مدل بیماری اعصاب شنوایی موش، تأثیر تریگونلین قهوه مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که تریگونلین به عنوان ماده اصلی ترکیب قهوه می‌تواند تأثیر مثبت بر بهبود بیماری اعصاب شنوایی ناشی از پیریدوکسین داشته باشد [٤٠]. تریگونلین همچنین در بهبود تشکیل نرون‌ها در سلول‌های نوروبلاستوما اهمیت فراوان دارد و با بازززایی آکسون‌ها و دندریت‌ها به درمان اختلال حافظه نیز کمک می‌کند [٤١].

جلوگیری از تجمع بتائین گلایسین در کشت سلولی بافت کلیه

در یک آزمایش کشت بافت، استفاده از مقدار زیاد تریگونلین (٢٥٠ میکرومول بر لیتر) در شرایط فشار اسمزی بالای (Hypertonic) محیط کشت، باعث جلوگیری از تجمع بتائین گلایسین $[(CH_3)_3N{+}CH_2CO_2^-]$ در سلول‌های کلیه سگ شد [٤٢]. بتائین گلایسین تجمع یافته در بافت داخلی کلیه، برای تنظیم فشار اسمزی بالای محیط در مقابل دناتوره شدن اوره در پستانداران به کار می‌رود. تریگونلین یک نوع مولکول بتائین است که دارای چهار بخش آمونیوم (R_4N^+) و یک بخش کربوکسیلات (CO_2^-) است [٢].

تولید تریگونلین در کشت درون شیشه

بررسی عصاره‌های کشت کالوس ریشه شنبلیله نشان داد که در حضور ATP و کلرید منیزیم، تبدیل اسید نیکوتنیک و اس- آدنوزیل‌متیونین به تریگونلین تسریع می‌شود [٤٣]. کشت کالوس شنبلیله ٤-٣ مرتبه تریگونلین بیشتری از بذرها و ١٣-١٢ مرتبه بیشتر از ریشه‌ها و ساقه‌های این گیاه دارد. همچنین در کشت سوسپانسیون مقدار این آلکالوئید بیشتر خواهد شد. توان تولید بالا در طی واکشت (Subculture) های پی در پی کشت کالوس و سوسپانسیون برای ٨ ماه پایدار می‌ماند و با گذشت زمان تریگونلین در کشت کالوس و سوسپانسیون تجمع می‌یابد [٤٤].

در تحقیقی دیگر از کشت کالوس ٨ هفته‌ای حاصل از بذر شنبلیله بر روی محیط کشت جامد تغییر یافته تنباکو (RT) با ١ میلی‌گرم در لیتر تو، فوردی‌کلروفنوکسی اسید استیک (2, 4- Dichlorophenoxyacetic acid)، مقدار ٤/٥ درصد تریگونلین تولید شد. با افزودن ٠/٥ تا ١ میلی‌گرم اسید نیکوتنیک، مقدار تریگونلین به ترتیب به ٥/٠١ و ٥/٢٥ درصد افزایش یافت [٤٤]. مقایسه مقدار تریگونلین توسط رادوان و کوکیت [٤٥] برای بذرها، ریشه‌ها و سرشاخه‌ها در کشت بافت آنها انجام شده است. ابتدا ریزنمونه‌ها در معرض غلظت‌های بالای تو، فور- دی، اسید ایندول استیک، اسید ایندول پروپیونیک، اسید نفتالیک استیک، جیبرلین و کینتین بررسی شدند و مشخص شد که استفاده از اکسین(ها) برای نمو کالوس مناسب‌تر است. انجام شوک‌های هورمونی به مدت ١ ساعت به طور قابل توجهی توانست رشد کالوس را تحریک کند. با وجود این که استفاده از تو، فوردی، اسید ایندول استیک، اسید ایندول پروپیونیک، اسید نفتالیک استیک (١٠ میلی‌گرم در لیتر) باعث افزایش مقدار تریگونلین شد، اما هورمون‌های جیبرلین (١ میلی‌گرم در لیتر) و کینتین (٢ میلی‌گرم در لیتر) اثرات مشخصی نداشتند. محیط کشت B_5 گامبورگ (Gamborg) که شامل ٣ گرم در لیتر هیدرولیزات کازئین، ٢ گرم در لیتر مخمر و ٤٠ گرم در لیتر ساکارز بود به عنوان محیط رشد استفاده شد. کالوس‌های چهار هفته‌ای شنبلیله، ١٥/٦ میلی‌گرم در گرم وزن خشک تریگونلین تولید کرد که ٤-٣ مرتبه بیشتر از بذر و ١٨-١٢ مرتبه بیشتر از ریشه‌ها و ساقه‌های گیاهان والد بود. از کشت‌های سوسپانسیون

Downloaded from jmp.ir at 22:26 +0330 on Tuesday September 28th 2021

٤ و ٦ هفته‌ای به ترتیب ۳۸/۲ و ٤٤/۲ میلی‌گرم در گرم وزن خشک تریگونلین، تولید شد که حدود ۲ برابر کشت کالوس بود. در بستر کشت جامد ۱۲-۹ درصد تریگونلین پخش و در کشت سوسپانسیون حدود یک سوم از تریگونلین در محیط مایع حل شد. بنابراین واضح است که با افزایش خروج این ترکیب از محل ساخت آن در سلول‌های درون محیط کشت، مقدار بیشتری از آن ساخته می‌شود. محیط‌های کشت حاوی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر اسید نیکوتنیک نسبت به محیط کشت دارای ۱ میلی‌گرم از این ماده زمینه‌ای، دارای مقدار تریگونلین بیشتری بودند. در عین حال، نسبت آلکالوئید آزاد شده درون محیط کشت مایع با حداقل و حداکثر اسید نیکوتنیک از ۳۱ درصد به ۳۷ درصد افزایش می‌یابد [٤٦]. امروزه در کشت‌های سلولی نگرش جدیدی برای تجمع سریع‌تر متابولیت‌های ثانویه ارایه می‌شود که با کاهش زمان مورد نیاز برای به دست آوردن کارآیی محصول همراه است. الکل سالیسیلیک و اسید سالیسیلیک ترکیبات اساسی سالیسیلات و گروه مهمی از ترکیبات دارویی هستند. مشاهده شده است که کاربرد این ماده، بروز ژن‌های مربوط به مکانیسم دفاعی را تحریک کرده و حفاظت جزیی در مقابل پاتوژن ایجاد می‌کند. گزارش شده است که اسید سالیسیلیک نقش مهمی در ایجاد مقاومت به بیماری در گیاه تنباکو دارد. در این تحقیق کالوس‌های دوماهه شنبلیله با دوزهای مختلف اسید سالیسیلیک در بستر کشت تیمار شدند و نتایج نشان داد که استفاده از اسید سالیسیلیک در محیط کشت سوسپانسیون کالوس‌های شنبلیله، باعث افزایش دوبرابری تولید تریگونلین در دوز ۰/۰۲۵ میلی‌مول بر لیتر نسبت به شاهد شده است [٤٧].

نقش متابولیکی تریگونلین در گیاهان

اعمال فیزیولوژیکی مختلفی برای تریگونلین در گیاهان ثبت و ارایه شده است، اما درباره بیوسنتز و متابولیسم این ترکیب کمتر بحث شده است. اولین بار، تریگونلین (ان- متیل نیکوتین آمید) به دلیل اهمیت در تأثیر بر مرحله G_2 (مرحله‌ای مابین انتهای مرحله سنتز و آغاز مرحله میتوز در چرخه سلولی است) در چرخه سلولی واقع در نوک ریشه گونه‌های گیاهی مورد توجه زیست‌شناسان قرار گرفت. بیشتر از ۲۰ سال است که تریگونلین به عنوان یک هورمون گیاهی معرفی شده است و تحقیقات بعدی مشخص کرد که اثر تریگونلین تنها به تنظیم چرخه سلولی محدود نمی‌شود و واکنش‌های گوناگونی را در گیاهان تنظیم می‌کند [٤٨] که در ذیل به برخی آنها اشاره می‌شود:

تنظیم چرخه سلولی

ایوانز و همکاران [٤٩] نشان دادند که تریگونلین موجود در لپه‌های نخود سبز باعث افزایش زمان توقف در مرحله G_2 چرخه سلولیِ مریستم‌های ریشه و ساقه می‌شود. ثابت شده است که تریگونلین حتی در مقادیر اندک (10^{-7} مول بر لیتر) نیز در این مکانیسم مؤثر می‌باشد. تریگونلین در ابتدای جوانه‌زنی بذرها به قسمت‌های دیگر گیاهچه منتقل می‌شود. این واقعیت که تریگونلین منتقل شده می‌تواند جایگزین تریگونلین لپه‌ها در روند توقف G_2 شود و از سوی دیگر نیز ارتباط بین مقدار تریگونلین گیاه با نسبت سلول‌های متوقف شده در G_2، نشان می‌دهد که تریگونلین می‌تواند مانند یک هورمون گیاهی عمل کند [۵۰]. مستندات جدیدتر نشان می‌دهد که تریگونلین با اتصال رپلیکون (مرحله‌ای مابین انتهای مرحله سنتز و آغاز مرحله میتوز در چرخه سلولی است) ها در طی فاز S چرخه سلولی، به عنوان تنظیم کننده چرخه سلولی عمل می‌کند [۵۱]. در آزمایشی بر روی گیاهچه‌های کاهو، میانگین اندازه رپلیکون در گیاهچه‌های تیمار شده با ۳ میلی‌مول تریگونلین، ۲/۵ برابر بلندتر از گیاهان شاهد بود. تریگونلین همچنین باعث افزایش زمان فاز S و چرخه سلولی

Downloaded from jmp.ir at 22:26 +0330 on Tuesday September 28th 2021

و نیز کاهش طول ریشه اولیه شد. فرضیه مازوکا و همکاران [۵۱] این است که عدم فعالیت رپلیکون پیش زمینه افزایش زمان فاز S و بازدارندگی رشد می‌باشد. همچنین، تیمار گیاه با تریگونلین باعث افزایش ۱/٦ برابری شاخه‌ای شدن رپلیکون نسبت به گیاه شاهد شد. روند سریع‌تر شاخه‌ای شدن در رپلیکون‌های بلندتر، هماهنگ با همبستگی بسیار مثبتی است که بین این روند و اندازه رپلیکون در گیاهان عالی غیرخویشاوند وجود دارد. همچنین مازوکا و همکاران [۵۲] توسط ردیابی تیمیدین (Thymidine) نشاندار شده در هستک متوجه شدند که تیمار گیاهان با تریگونلین باعث بزرگی و سنگینی هستک درسلول این گیاهان می‌شود. این تغییرات هستک رابطه مشخصی با مقادیر مختلف تریگونلین دارد. چون به دنبال دوره بازسازی پس از تنش خشکی، اندازه هستک به سرعت کاهش می‌یابد. نتایج نشان می‌دهد که تریگونلین نقش خود را در تغییرات هستک، از طریق ساخت پروتئین‌های جدید اعمال می‌کند چون این تغییرات در ریشه‌های تیمارشده با تریگونلین، همراه با تغییرات در الگوی پروتئینی گیاه می‌باشد.

تشکیل گره‌های (Nodulation) ریشه‌ای در لگوم‌ها

تریگونلین در محدوده وسیعی از گونه‌های گیاهی به ویژه در بذرها و ریشه گیاهان خانواده لگوم به وفور وجود دارد. این ترکیب در مواد مترشحه از ریشه لگوم‌ها وجود دارد و نسخه برداری ژن گره‌سازی (Nod) را در ریزوبیوم با فعال کردن پروتئین تنظیمی $NodD_2$ تحریک می‌کند. به نظر می‌رسد که تریگونلین مانند دیگر متابولیت‌های ثانویه گیاهی (از جمله ترکیبات فنولیک) عملکردی چندگانه هم در گیاه و هم در میکروارگانیسم‌های همزیست با گیاه دارد. برخی عقیده دارند که تجمع تریگونلین در لگوم میزبان در اولین مراحل جوانه‌زنی بذر رخ می‌دهد و در برهم کنش ابتدایی گیاه ــ باکتری نقش دارد. علاوه بر این حضور همزمان تریگونلین در لگوم میزبان و نیز ژن‌های تجزیه کننده مشابه آن در مگاپلاسمید pSym ریزوبیوم نشان می‌دهد که تریگونلین به عنوان ماده غذایی توسط نژادهای ریزوبیومی (Rhizobial strain) استفاده می‌شود [۵۳]. این خصوصیت ممکن است برای ماندگاری موجودات ریزوسفر، افزایش کارآیی آلودگی گیاه با باکتری و نیز به عنوان نشانه‌ای در ابتدای مراحل کلونسازی گیاهچه مفید باشد [٥٤]. نتایج یک تحقیق در محیط کشت گیاه کهور *Prosopis laevigata* Willd که با اسپورهای قارچ *Gigaspora rosea* Nicol. & Schenck تلقیح شده بود، نشان داد میزان تریگونلین در بخش‌های هوایی گیاه با یا بدون قارچ مزبور ثابت بوده اما میزان آن در ریشه‌ها و با وجود قارچ ۱/۸ برابر افزایش می‌یابد. تریگونلین ممکن است عامل تنظیمی در مراحل ابتدایی استقرار قارچ همزیست در گیاه کهور باشد [۵۵].

تنش‌های اکسیداتیو و فرابنفش

برگلاند [٥٦] اظهار می‌کند که نیکوتین آمید بخش مهمی از زنجیره انتقال پیام در گیاهان در پاسخ به شکستگی DNA، به ویژه در ارتباط با تنش‌های اکسیداتیو می‌باشد. در سلول‌های تحت تنش، نیکوتین آمید در نتیجه فعالیت آنزیم هسته‌ای پلی‌ای دی پی ریبوز پلیمراز (PADPRP) آزاد می‌شود. PADPRP در اثر انواع تنش‌های منجر به شکستگی مسیر DNA، شامل تنش اکسیداسیون، تنش اشعه فرابنفش و مواد جهش‌زا، فعال می‌شود. فعالیت این آنزیم در ژن رخ نمی‌دهد، بلکه از طریق برهم‌کنش آنزیم و DNA آسیب دیده فعال می‌شود. این آنزیم پلیمرهایی از ADP-Rib را می‌سازد که به پروتئین‌های متصل به DNA پیوسته هستند. ADP-Rib که در این مرحله مصرف می‌شود از NAD تامین می‌شود و برگلاند [٥٦] عقیده دارد که نیکوتین آمید و تریگونلین به عنوان محرک‌های قوی متابولیسم دفاعی در گیاهان، شامل متابولیسم

Downloaded from jmp.ir at 22:26 +0330 on Tuesday September 28th 2021

گلوتاتیون و تجمع ترکیبات دفاعی ثانویه، به کار می‌روند. کالبین و همکاران [۵۷] پی‌بردند که اشعه قوی فرابنفش باعث افزایش قابل توجه در مقدار نیکوتین آمید، تریگونلین و گلوتاتیون اکسید شده کل در برگ‌های نخود سبز می‌شود. آنها نتیجه گرفتند که تغییر مقدار تعیین شده نیکوتین آمید و تریگونلین در واکنش به اشعه فرابنفش زمانی رخ می‌دهد که تابش به اندازه کافی تنش‌زا باشد. به این ترتیب، نیکوتین آمید و متابولیت‌های آن (به خصوص تریگونلین) به عنوان ناقل پیام در واکنش گیاهان به تنش اکسیداتیو عمل می‌کند و آنزیم پلی‌مراز پلی (ADP-Rib) نقش مهمی در تحریک متابولیسم دفاعی دارد [۵۷].

متیله‌کردن DNA

ثابت شده است که اثرات فیزیولوژیکی تریگونلین و دیگر ترکیبات چهارآمونیومی در گیاهان در طی متیله کردن DNA رخ می‌دهد. تریگونلین، کولین و بتائین دارای نقش عمده و فعالی در واکنش‌های متیلاسیون گیاهی می‌باشند [۴۸]. در مورد تریگونلین، برگلاند [۵۶] بیان می‌کند که واکنش آمین‌زدایی نیکوتین آمید و تشکیل اسید نیکوتنیک با متیله‌کردن اسید نیکوتنیک به تریگونلین دنبال می‌شود، و اس- آدنوزیل‌ـ متیونین به عنوان عامل دهنده متیل در متیلاسیون DNA، به کار می‌رود. چون متیله نمودن DNA به طور کلی با نسخه‌برداری DNA پیوسته است، این عمل نقش واسط در اثرات تریگونلین بر روی چرخه سلولی دارد.

تنش شوری و خشکی

بسیاری از گیاهان در واکنش به مقدار زیاد نمک در محیط، تنظیم‌کننده‌های اسمزی مانند گلایسین بتائین، پرولین و تریگونلین را در خود جمع می‌کنند تا از هدر رفتن آب گیاه جلوگیری کنند. ترامونتانو و ژوو [۵۸] پی‌بردند که گیاه یونجه افزایش ۵ برابری پرولین و ۲ برابری تریگونلین را بعد از القای تنش شوری داشته است. تحقیقات بیشتر برای مقایسه نحوه اثر تریگونلین و تنظیم کننده‌های اسمزی دیگر (مانند پرولین و بتائین‌گلایسین) بر پارامترهای چرخه سلولی در مریستم‌های ریشه کشت شده نخودسبز، نشان داد که غلظت‌های $۱۰^{-۴}$ تا $۱۰^{-۷}$ مول بر لیتر تریگونلین، باعث افزایش مقدار مولکول‌های خاص هسته‌ای در مرحله G_2 می‌شود، در حالی‌که بتائین‌گلایسین فقط اندکی در بهبود تجمع این مواد در G_2 مؤثر بوده و پرولین بی‌اثر است. این نتایج ثابت می‌کند که نحوه اثر تریگونلین بر چرخه سلولی منحصر به فرد است و تریگونلین می‌تواند نقش تنظیم‌کننده اسمزی را در گیاهان تحت تنش شوری ایفا کند. بررسی میزان تریگونلین گیاه سویا در شرایط تنش شوری نشان داده است که اکثر ژنوتیپ‌های سویا که در معرض تنش شوری و کم آبی هستند و یا با این شرایط سازگار شده‌اند، مقدار تریگونلین در برگ‌های جوان گیاه به طور قابل توجهی افزایش یافته و سپس در مرحله زایشی با رشد غلاف و رسیدن بذر، کاهش می‌یابد [۴۸].

رابطه بین کارآیی تولید گره و تثبیت نیتروژن در شرایط تنش رطوبت، بستگی به مرحله رشد گیاهان دارد. تنش خشکی در طی رشد رویشی، تولید گره و تثبیت نیتروژن را بیشتر از مرحله زایشی تحت تأثیر قرار می‌دهد. تعداد اندک گره‌های روی ریشه قادر به تامین نیتروژن مورد نیاز گیاه نبوده و در نتیجه گیاه برای رشد بهتر متکی به نیتروژن خاک می‌باشد. اصلاح محصول برای تحمل خشکی مسأله بحرانی برای تولید محصول در آینده است. در گیاهان، تریگونلین به عنوان یک متابولیت دفاعی در واکنش به کمبود آب افزایش می‌یابد و نتیجه آن کاهش تعداد گره‌ها و عملکرد است. برای جلوگیری از این کاهش بهتر است از ریزوبیوم‌ها استفاده شود. فعالیت ریزوبیوم‌های همزیست به گیاهان کمک می‌کند که عملکرد را به ویژه در شرایط آبیاری کامل بهبود دهند. نتایج تحقیقی نشان

Downloaded from jmp.ir at 22:26 +0330 on Tuesday September 28th 2021

داد تنش خشکی در گیاه بادام زمینی سبب افزایش غلظت تریگونلین در ژنوتیپ‌های مختلف بادام زمینی در آبیاری کم در مقایسه با شرایط آبیاری کامل شده‌است [۵۹].

واکنش شب‌تنجشی (Nyctinasty) **برگ** (شب خسبی برگ)

در آزمایشگاه دانشگاه یودا (Masahiro Ueda Osaka University) در ژاپن، مطالعات متعددی بر روی عصاره‌های برگی جهت تعیین مواد و فاکتورهای مؤثر در مکانیسم تحریک بسته شدن برگ در گونه‌های مختلف گیاهی دارای این مکانیسم انجام شده است. در این راستا، تریگونلین به عنوان یک ماده فعال زیستی برای واکنش شب تنجشی از *Aeschynomene indica* ایزوله شد. بررسی‌ها نشان داد که ۰/۱ میکرومول بر لیتر از این ترکیب برای بسته‌شدن برگ گیاه مذکور در طول روز کافی بود اما در گونه‌های دارای مکانیسم حرکت خواب، مانند *Cassia mimosoides* و *Mimosa pudica* چندان مؤثر نبود. تریگونلین با اسید ایندول استیک رقابت می‌کند که در مکانیسم باز شدن برگ مؤثر است. به نظر می‌رسد که تریگونلین ممکن است درگیر در تنظیم فعالیت‌های ساعت بیولوژیکی و ریتم سیرکادین (Circadian rhythm) (ریتم خواب که همراه باز وبسته شدن برگ است) در برخی از گیاهان مانند *A. indica* باشد [۴۸].

شناسایی، استخراج و سنتز تریگونلین به روش‌های آزمایشگاهی

الف – شناسایی و استخراج تریگونلین به روش اسپکتروفتومتری اشعه فرابنفش و HPLC

چندین روش برای استخراج و تعیین مقدار تریگونلین ارائه شده است که بیشتر آنها براساس یک مرحله مشتق‌گیری عمل می‌کنند. مانند اسپکترفتومتری اشعه فرابنفش، اسپکترومتری جرمی، HPTLC با تعیین اشعه فرابنفش، HPLC با تعیین اشعه فرابنفش شامل روش‌هایی با مشتق‌گیری با ۲- نفتاسیل سولفونات تری‌فلورومتان یا فنیل‌ایزوتیوسیانات، HPLC همراه با MS و الکتروفورز مویین با تعیین اشعه فرابنفش با استر پی برموفناسیل کار شده است. این روش‌ها هم برای نمونه‌های گیاهی و هم حیوانی استفاده شده است [۶۰،۶۱].

برای تعیین و ارزیابی مقدار آلکالوئید تریگونلین به روش اسپکتروفتومتری فرابنفش (UV)، پودر نمونه‌های تهیه شده را به میزان یک گرم به دقت توزین و با یک گرم اکسید منیزیم و ۵۰ میلی‌لیتر آب مخلوط کرده و به مدت ۲۰ دقیقه در بن‌ماری با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار می‌دهیم. سپس آن‌را به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده و پس از صاف‌کردن، جذب نوری نمونه‌ها را در مقابل نمونه شاهد در طول موج ۲۶۸ نانومتر می‌خوانیم و با استفاده از منحنی استاندارد تریگونلین، مقدار آن‌را در نمونه‌های مجهول تعیین می‌کنیم. بر اساس گزارش روش‌های فارماکوپه‌ای طول موج بهینه برای اندازه‌گیری تریگونلین ۲۶۸ نانومتر و برای اندازه‌گیری اسید نیکوتینیک ۲۶۴ نانومتر می‌باشد [۶۰،۶۱].

امروزه روش HPLC به عنوان روشی رایج، جایگزین روش سنجش اسپکتروفتومتری شده است. مثلاً در گیاه قهوه، دانه‌های آن را از مناطق مختلف جمع‌آوری و پودر می‌کنند و سپس در فلاسک‌های پلی‌اتیلن نگهداری می‌کنند. قبل از آنالیز، نمونه‌ها را باید در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد خشک کرد تا وزن آن ثابت شود. برای تهیه محلول‌های سنجش تریگونلین، سه گرم از نمونه خشک شده با آب گرم ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت ریفلاکس (Reflux is a technique of vapors and the condensationinvolving the return of this condensate to the system from which it originated) شده سپس این عصاره را صاف کرده و با آب مقطر به حجم ۲۵۰ میلی‌لیتر می‌رسانیم. محلول حاصل به صورت ۱:۵ حجمی/حجمی رقیق شده و ۳ میلی‌لیتر از آن پس از عبور از صافی با قطر ۰/۴۵ میکرومتر به دستگاه HPLC با ستون C_{18} تزریق می‌شود. قابل ذکر است که فاز متحرک شامل

Downloaded from jmp.ir at 22:26 +0330 on Tuesday September 28th 2021

اسید کلریدریک ۲ میلی‌مول بـر لیتـر آب (pH=3) و سـرعت جریان ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه می‌باشد [٦١].

برای تهیه استاندارد، پودر آن را پس از اندازه‌گیری دقیق در ۵ بالن ژوژهٔ جداگانه ریخته و جهت تهیهٔ غلظت‌هـای مناسـب (۰/۱، ۰/۲، ۰/۵، ۰/۷ و ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) با آب به حجم رسانده و در ادامه به کمک دستگاه اولتراسونیک کاملاً انحـلال صورت خواهد گرفت و پس از فیلتراسیون بـا فیلتـر میکرونـی مخصوص از هر کدام از محلول‌های به دسـت آمـده ٤ نمونـه داخل دستگاه خودکار (Autosampler) تزریـق قـرار خواهـد گرفت. از روی مساحت زیرمنحنی به دسـت آمـده بـر حـسب غلظت، منحنی کالیبراسیون برای نمونه‌های استاندارد تریگونلین به طور مجزا رسم می‌شـود. سـپس از روی فرمـول رگرسـیون (y=ax+b) مقادیر مجهول در نمونه‌ها محاسبه می‌شود [٦٠].

ب- سنتز به روش هیدروکلراید تریگونلین

۱۰ گرم اسید نیکوتنیـک و ۱۲ گـرم متیـل یدیـد را بـا ۱۵ میلی‌لیتر متانول خشک در یک بطری ۳۰۰ میلی‌لیتـری مخلـوط کرده و به مدت ۳ ساعت در دمای ۱۵۰ درجه سـانتی‌گـراد در اتوکلاو حرارت داده می‌شود. سپس محصول به دست آمـده را در آب حل کرده و مقدار زیادی اکسید نقره آبدار به آن اضـافه می‌شود. مایع حاصـل را صـاف کـرده و بـا ۷ میلـی‌لیتـر اسـید کلریدریک غلیظ مخلوط کـرده کـه بعـد از تبخیـر، یـک تـوده کریستالی آبدار به دست می‌آید. به ایـن جـرم کریـستالی، ۳۰۰ میلی‌لیتر الکل ۹۰ درصد داغ اضافه کرده و یک شب در یخچال قرار می‌دهند تا کلرید تریگونلین ($C_7H_8NO_2Cl$) بـه صـورت کریستال جدا شود. رسوب حاصل با الکل سرد و اتـر شستـشو داده و در نهایت کلریـد تریگـونلین بـا نقطـه ذوب ۲۵۹-۲۵۸ درجه سانتی‌گراد حاصل می‌شود. با تغلیظ محلول مادر (اولیه)، ۲ گرم دیگر فرآورده خالص تولید می‌شود [٦٢].

ج ـ سنتز به روش اسید سولفات تریگونلین

در یک بالون یک لیتری سه دهانه که مجهز به یـک همـزن مکانیکی است، ٢٤/٦ گـرم اسـید نیکوتنیـک (۰/۳ مـول) و ۳۸ گرم دی‌متیل سولفات (۰/۳ مول) ریخته و به مـدت ٤ سـاعت در دمای ۱۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار می‌دهنـد. جـرم غلـیظ بـه دست آمـده را بعـد از سـرد شـدن در ۲۰۰ میلـی‌لیتـر آب و ۱ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۱۰ نرمال حـل کـرده تـا متیـل اسـتر تریگونلین هیدروژن سولفات تجزیه شود. ایـن ترکیـب تبخیـر شده تا شربت غلیظی به حجم٦٠ میلی‌لیتر ایجاد شود. بـه ایـن غلظت ۲۰۰ میلی‌لیتر الکل داغ اضافه کـرده و همـراه بـا ذغـال فعال آن را جوشانده تـا بـی‌رنـگ شـود و سـپس آن را صـاف می‌کنند. مایع صاف شده را در سرما قرار مـی‌دهنـد تـا متبلـور شـود. سـپس ٢٥/٦ گـرم از تریگـونلین هیـدروژن سـولفات ($C_7H_9NO_6S$) خالص را صاف کرده و بـا الکـل سـرد و اتـر شستشو می‌دهند. با اضافه کردن الکل به محلـول مـادر (اولیـه) ٤/٧ گرم کریستال خالص به دست می‌آید. نقطه ذوب هرکـدام از نمونه‌ها ۲۰۰ - ۱۹۹ درجـه سـانتی‌گـراد اسـت. تریگـونلین هیـدروژن سـولفات در آب محلـول اسـت و ۱ گـرم از آن بـه آسانی در ۱ میلی‌لیتر آب حل می‌شود [٦٢].

تشکر و قدردانی

از همکاری صمیمانه جناب آقای دکتر سعید کیـان‌بخـت و سرکار خانم دکتر فرحناز خلیقی‌سیگارودی قدردانی مـی‌شـود. این پژوهش با حمایت گروه پژوهشی کشت و توسعه و گـروه پژوهـشی بیوتکنولـوژی پژوهـشکده گیاهـان دارویـی جهاددانشگاهی در کرج انجام شده است.

Downloaded from jmp.ir at 22:26 +0330 on Tuesday September 28th 2021

منابع

1. Qavami N, Mehrafarin A, Naghdi Badi H and Qaderi A. Survey of trigonelline, a secondary metabolite in plants. 1th Iranian Congress on Herbal Drugs. Shahre kord, Iran. 2001, 346 p.

2. Zeiger E. Trigonelline; Review of Toxicological Literature. Ph.D. Thesis. National Institute of Environmental Health Sciences. North Carolina, USA. 1997, 21 p.

3. Yuyama S and Suzuki T. The excretion of *N'*-methyl-2-pyridone-5-carboxylic acid and related compounds in human subjects after oral administration of nicotinic acid, trigonelline, and *N'*-methyl-2-pyridone-5-carboxylic acid. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1991; 294: 475 - 9.

4. Yuyama S and Kawano Y. Urinary excretion of *N'*-methyl-2-pyridone-5-carboxylic acid and the fate of remaining of trigonelline. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1996; 398: 599 - 603.

5. Taguchi H, Sakaguchi M and Shimabayashi Y. Trigonelline content in coffee beans and the thermal conversion of trigonelline into nicotinic acid during the roasting of coffee beans. *Agric. Biol. Chem*. 1985; 49 (12): 3467 - 72.

6. Ito Y, Suzuki T, Shirai T and Hirano T. Presence of cyclic betaines in fish. *Comp. Biochem. Physiol*. 1994; 199B (1): 115 - 24.

7. Carter EGA and Carpenter KJ. Trigonelline not a metabolite of bound niacin from cereals. *Fed. Proc*. 1981; 40 (3): 36 - 40.

8. Ashihara H, Deng W and Nagai C. Trigonelline biosynthesis and the pyridine nucleotide cycle in *Coffea arabica* fruits: Metabolic fate of [*carboxyl*-^{14}Cnicotinic acid riboside. *Phytochemistry Letters* 2011; 4 (2): 158 - 68.

9. Tramontano WA, McGinley PA, Ciancaglini EF and Evans LS. A survey of trigonelline concentrations in dry seeds of the Dicotyledoneae. *Environ. Exp. Bot*. 1986; 26 (3): 197 -205.

10. Viani R and Horman I. Thermal behavior of trigonelline. *J. Food Sci.* 1974; 39 (6): 1216 - 7.

11. Anthoni U, Christophersen C, Hougaard L and Nielsen PH. Review: Quaternary ammonium compounds in the biosphere—an example of a versatile adaptive strategy. *Comp. Biochem. Physiol*. 1991; 99B (1): 1 - 18.

12. Fung VA, Cameron TP, Hughes TJ, Kirby PE and Dunkel VC. Mutagenic activity of some coffee flavor ingredients. *Mutat. Res*. 1988; 204: 219 - 28.

13. Wu X, Skog K and Jägerstad M. Trigonelline, a naturally occurring constituent of green coffee beans behind the mutagenic activity of roasted coffee. *Mutat. Res*. 1997; 391: 171 - 7.

14. Zheng XQ and Ashihara H. Distribution, biosynthesis and function of purine and pyridine alkaloids in *Coffea Arabica* seedlings. *Plant Sci*. 2004; 166: 807 - 13.

15. Joshi JG, Handler P. Biosynthesis of trigonelline. *J. Biol. Chem*. 1960; 235: 2981 - 3.

16. Upmeier B, Gross W, Koster S and Barz W. Purification and properties of S-adenosyll-methionine: nicotinic acid-Nmethyltransferase from cell suspension cultures of *Glycine max* L. *Arch. Biochem. Biophys*. 1988; 262: 445 - 54.

17. Taguchi H, Nishitani H, Okumura K, Shimabayashi Y and Iwai K. Biosynthesis and metabolism of trigonelline in *Lemna paucicostata*. *Agric. Biol. Chem*. 1989; 53: 2867 - 71.

18. Taguchi H and Shimabayashi Y. Findings of trigonelline demethylating enzyme activity in various organisms and some properties of theenzyme from hog liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1983; 113: 569 - 74.

19. Shimizu MM and Mazzafera P. A role for trigonelline during imbibition and germination of coffee seeds. *Plant Biol.* 2000; 2: 605 - 11.

20. Willeke U, Heeger V, Meise M, Neuhann H,

Downloaded from jmp.ir at 22:26 +0330 on Tuesday September 28th 2021

Schindelmeiser I, Vordemfelde K and Barz W. Mutually exclusive occurrence and metabolism of trigonelline and nicotinic acid arabinoside in plant cell cultures. *Phytochem*. 1979; 18: 105 - 10.

21. Mehrafarin A, Qaderi A, Rezazadeh Sh, Naghdi Badi H, Noormohammadi Gh and Zand E. Bioengineering of important secondary metabolites and metabolic pathways in fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.). *J. Medicinal Plants* 2010; 9 (35): 1 - 18.

22. Katoh A and Hashimoto T. Molecular biology of pyridine nucleotide and nicotine biosynthesis. *Frontiers in Bioscience* 2004; 9: 1577 – 86.

23. Revollo JR, Grimm AA and Imai SI. The NAD biosynthesis pathway mediated by nicotinamide phosphoribosyltransferase regulates Sir_2 activity in mammalian cells. *J. Biological Chem*. 2004; 279: 50754 – 63.

24. Zheng X, Hayashibe E and Ashihara H. Changes in trigonelline (N-methylnicotinic acid) content and nicotinic acid metabolism during germination of mungbean (*Phaseolus aureus*) seeds. *J. Experimental Botany* 2005; 56 (416): 1615 – 23.

25. Martınez-Villaluenga C, Kuo Y-H, Lambein F, Frıas J and Vidal-Valverde H. Kinetics of free protein amino acids, free non-protein amino acids and trigonelline in soybean (*Glycine max* L.) and lupin (*Lupinus angustifolius* L.) sprouts. *Eur. Food Res. Technol*. 2006; 224: 177 – 86.

26. Bodor N and Farag HH. Improved delivery through biological membranes. II. A redox chemical drug-delivery system and its use for brain-specific delivery of phenylethylamine. *J. Med. Chem*. 1983; 26: 313 - 8.

27. Palomino E, Kessel D and Horwitz JP. A dihydropyridine carrier system for sustained delivery of 2', 3'-dideoxynucleosides to the brain. *J. Med. Chem*. 1989; 32: 622 - 5.

28. Pop E, Shek E, Murakami T and Bodor NS. Improved anticonvulsant activity of phenytoin by a redox brain delivery system I: Synthesis and some properties of the dihydropyridine derivatives. *J. Pharm. Sci*. 1989; 78 (8): 609 - 16.

29. Chikhale P and Bodor N. Improved delivery of acyclovir to the skin using a dihydrotrigonelline trigonelline redox carrier. *J. Pharm. Sci*. 1991; 80 (4): 402 - 3.

30. Ghosh A, Shieh JJ, Pan CJ, Sun MS and Chou JY. The catalytic center of glucose-6-phosphatase. HIS176 is the nucleophile forming the phosphohistidine-enzyme intermediate during catalysis. *J. Biol. Chem*. 2002; 277 (36): 32837 – 42.

31. Monago C C and Nwodo OFC. Antidiabetic Effect of Crude Trigonelline of *Abrus precatorius* Linn Seed in Alloxan Diabetic Rabbits. *J. Pharmacy Res.* 2010; 3 (8): 1916 - 9.

32. Yoshinari O, Sato H and Igarashi K. Anti-diabetic effects of pumpkin and its components, trigonelline and nicotinic acid, on Goto-Kakizaki rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 2009; 73 (5): 1033 - 41.

33. Van Dijk AE, Olthof MR, Meeuse JC, Seebus E, Heine RJ and Van Dam RM. Acute effects of decaffeinated coffee and the major coffee components chlorogenic acid and trigonelline on glucose tolerance. *Diabetes Care* 2009; 32 (6): 1023 - 5.

34. Mishkinsky JS, Goldschmied A, Joseph B, Ahronson Z and Sulman FG. Hypoglycaemic effect of *Trigonella Foenum Graecum* [*sic*] and *Lupinus Termis* (Leguminosae) seeds and their major alkaloids in alloxan-diabetic and normal rats. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 1974; 210: 27 - 37.

35. Hirakawa N, Okauchi R, Miura Y and Yagasaki K. Anti-invasive activity of niacin and trigonelline against cancer cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2005; 69 (3): 653 - 8.

36. Almeida A. Antibacterial activity of coffee extracts and selected coffee chemical compounds against enterobacteria. *J. Agricultural and Food*

Downloaded from jmp.ir at 22:26 +0330 on Tuesday September 28th 2021

Chem. 2006; 54: 8738 - 43.

37. Daglia M, Tarsi R, Papetti A, Grisoli P, Dacarro C, Pruzzo C and Gazzani G. Antiadhesive effect of green and roasted coffee on Streptococcus mutans' adhesive properties on saliva-coated hydroxyapatite beads. *J. Agric. Food Chem.* 2002; 50: 1225 – 9.

38. Yackley KM. Identification of a novel phytoestrogen: trigonelline. Ph.D. thesis. University of Texas. USA. 2008, pp: 1 - 17.

39. Aswar U, Mohan V and Bodhankar SL. Effect of trigonelline on fertility in female rats. *International Journal of Green Pharmacy* 2009; 4: 220 - 3.

40. Hong BN, Yi TH, Kim SY, and Kang TH. High-Dosage Pyridoxine-Induced Auditory Neuropathy and Protection with Coffee in Mice. *Biol. Pharm. Bull.* 2009; 32 (4): 597 - 603.

41. Tohda C, Kuboyama T and Komatsu K. Search for natural products related to regeneration of the neuronal network. *Neurosignals* 2005; 14 (1 - 2): 34 - 45.

42. Randall K, Lever M, Peddie BA and Chambers ST. Accumulation of natural and synthetic betaines by a mammalian renal cell line. *Biochem.Cell Biol*. 1996; 74: 283 - 7.

43. Antony A, Gopinathan KP, Vaidyanathan CS. Biosynthesis of trigonelline in root cultures of Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.). *Indian J. Exp. Biol*. 1975; 13: 39 - 41.

44. Mehrafarin A, Rezazadeh Sh, Naghdi Badi H, Noormohammadi Gh and Qaderi A. A Review on Biology, Cultivation and Biotechnology of Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) as a Valuable Medicinal Plant and Multipurpose. *J. Medicinal Plants* 2011; 10 (37): 6 - 24.

45. Radwan SS, Kokate CK. Production of higher levels of trigonellin by cell cultures of *Trigonella foenum - graecum* than by the differentiated plant. *Planta* 1980; 147: 340 – 4.

46. Christen P. *Trigonella* species: In Vitro Culture and production of Secondary Metabolites. In Nagata T, Ebizuka Y. (*eds*.), Medicinal and aromatic plants (Vol.12). Biotechnology in Agriculture and Forestry 51. Springer. 2002, pp: 306 - 48.

47. Mathur L and Yadav R. Effect of salicylic acid on trigonelline production in *Trigonella foenum-graecum* L. cell suspension culture. *International Referred Reseach Journal.* 2011; 1 (17): 137 - 8.

48. Minorsky PV. Trigonelline: a diverse regulator in plants. *Plant Physiology* 2002; 128 (1): 7 - 8.

49. Evans LS, Almeida MS, Lynn DG and Nakanishi N. Chemical characterization of a hormone that promotes cell arrest in G_2 in complete tissues. *Sci*. 1979; 203: 1122 – 3.

50. Evans LS and Tramontano WA. Is trigonelline a plant hormone pea seedlings. *Am. J. Bot*. 1981; 68: 1282 – 9.

51. Mazzuca S, Bitonti MB, Innocenti AM and Francis D. Inactivation of DNA replication origins by the cell cycle regulator, trigonelline, in root meristems of *Lactuca sativa*. *Planta* 2000; 211: 127 – 32.

52. Mazzuca S, Bitonti MB, Pranno S and Innocenti AM. Nuclear metabolic changes in root meristem of *Lactuca sativa* induced by trigonelline treatment. *Cytobios* 1997; 89: 39 – 50.

53. Boivin C, Camut S, Malpica CA, Truchet G and Rosenberg C. *Rhizobium meliloti* genes encoding catabolism of trigonelline are induced under symbiotic conditions. *Plant Cell*. 1990; 2: 1157 – 1170.

54. Boivin C, Barran LR, Malpica CA and Rosenberg C. Genetic Analysis of a Region of the Rhizobium meliloti pSym Plasmid Specifying Catabolism of Trigonelline, a Secondary Metabolite Present in Legumes. *Journal of Bacteriol*. 1991; 173 (9): 2809 - 17.

Downloaded from jmp.ir at 22:26 +0330 on Tuesday September 28th 2021

55. Rojas-Andrade R, Cerda-García-Rojas CM, Frías-Hernández JT, Dendooven L, Olalde-Portugal V and Ramos-Valdivia AC. Changes in the concentration of trigonelline in a semi-arid leguminous plant (*Prosopis laevigata*) induced by an arbuscular mycorrhizal fungus during the pre symbiotic phase. *Mycorrhiza* 2003; 13 (1): 49 – 52.

56. Berglund T. Nicotinamide, a missing link in the early stress response in eukaryotic cells - a hypothesis with special reference to oxidative stress in plants. *FEBS Lett*. 1994; 351: 145 – 9.

57. Berglund T, Kalbin G, Strid A, Rydstrom J and Ohlsson AB. UV-B and oxidative stress-induced increase in nicotinamide and trigonelline and inhibition of defensive metabolism induction by poly (ADPribose) polymerase inhibitor in plant tissue. *FEBS Lett*. 1996; 380: 188 – 93.

58. Tramontano WA, Jouve D. Trigonelline accumulation in salt stressed legumes and the role of other osmoregulators as cell cycle control agents. *Phytochem*. 1997; 44: 1037 – 40.

59. Cho Y, Kodjoe E, Puppala N and Wood AJ. Reduced trigonelline accumulation due to rhizobial activity improves grain yield in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B - Soil & Plant Science.* 2011; 61 (5): 395 - 403.

60. Oraei H. Comparison and validate of investigation of Trigonelline amount of fenugreek seed by HPLC and spectrophotometer (UV) methods. Pharmacy thesis. Medicinal Science University of Tehran. 2009, 354 pp.

61. Martin MJ, Pablos F, Bello MA and Gonzalez AG. Determination of trigonelline in green and roasted coffee from single column ionic chromatography. *Fresenius J. Anal Chem.* 1997; 357: 357 - 8.

62. Sarett HP, Perlzweig WA and Levy ED. Synthesis and excretion of trigonelline. *FEBS Lett.* 1940; 2: 483 - 5.