تعیین مقدار ٤ - هیدروکسی ایزولوسین در دانه شنبلیله تیمار شده و تیمار نشده با استفاده از GC

محمدرضا حائری[۱]، محمدرضا شمس‌اردکانی[۲]*، محمد رهبانی[۳]، محمد ایزددوست[٤]، مهناز خانوی[٥]

۱- استادیار، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قم، قم
۲- دانشیار، گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران
۳- استاد، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز
٤- استادیار، گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران
٥- استادیار، گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران
*آدرس مکاتبه: تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده داروسازی، ساختمان جدید، طبقه سوم، گروه فارماکوگنوزی، تلفن و نمابر: ٦٦٤٨٢٧٠٧ داخلی ۱۳۳۳ (۰۲۱)
پست الکترونیک: shams@tums.ac.ir

تاریخ دریافت: ۸۵/۲/۲۵ **تاریخ تصویب:** ۸٦/۱۰/۲۲

چکیده

مقدمه: گزارش‌هایی مبنی بر خصوصیات آنتی‌دیابتیک ترکیب ٤ - هیدروکسی ایزولوسین وجود دارد، اما به هرحال معرفی این ترکیب به عنوان داروی جدید نیازمند اثبات کامل اثرات مفید آن در درمان بیماری دیابت و همچنین یافتن روش‌های مناسب تهیه مقدار کافی از آن می‌باشد تا انجام مطالعات **in vivo** امکان‌پذیر شود.

هدف: این پژوهش به منظور جداسازی ٤ - هیدروکسی ایزولوسین از دانه شنبلیله و مقایسه مقادیر آن در دانه‌هایی که در نقاط مختلف ایران کشت شده بود، انجام شد. به علاوه اثر جوانه‌زدن دانه و یا اضافه کردن ایزولوسین (پیش‌ساز ٤ - هیدروکسی ایزولوسین) به دانه در هنگام آبیاری بر مقدار تحصیل ٤ - هیدروکسی ایزولوسین نیز از اهداف دیگر این مطالعه بود.

روش بررسی: ٤ - هیدروکسی ایزولوسین با عبور عصاره آمینواسیدی دانه‌های شنبلیله از ستون‌های تعویض یونی و سلیکا ژل و سپس کریستاله کردن با متانول جداسازی شد. از دستگاه **GC** برای مقایسه محتوای ٤- هیدروکسی ایزولوسین در عصاره دانه‌های گرفته شده از مناطق مختلف، عصاره دانه‌های جوانه زده و دانه‌های آبیاری شده با ایزولوسین استفاده شد.

نتایج: دانه‌های مربوط به شمال شرقی ایران دارای مقادیر زیادی از این ماده است، به علاوه جوانه زدن دانه گیاه منجر به افزایش ۲ برابری و اضافه کردن ایزولوسین منجر به افزایش ٦ برابری در مقدار ٤ - هیدروکسی ایزولوسین تولیدی می‌شود.

نتیجه‌گیری: یک روش ساده برای افزایش تحصیل ٤ - هیدروکسی ایزولوسین تا حدود ٦ برابر، استفاده از دانه‌های جوانه زده شنبلیله است که با ایزولوسین تیمار شده‌اند.

گل‌واژگان: ٤ - هیدروکسی ایزولوسین، شنبلیله، **GC**

[Downloaded from jmp.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2010.9.34.8.6]

مقدمه

شنبلیله[1] گیاهی یکساله و از خانواده Papilionaceae [2] می‌باشد و به مقدار فراوانی در نقاط مختلف دنیا مخصوصاً آسیا، آفریقا و نقاط مختلف ایران کشت می‌شود. سالیان درازی دانه‌های این گیاه علاوه بر استفاده‌های خوراکی، به عنوان داروی گیاهی نیز مورد مصرف قرار می‌گرفته است. در فارماکوپه باستانی، دانه شنبلیله برای خاصیت کاهندگی قند خون و درمان مشکلات دیابت مورد استفاده قرار می‌گرفته است [۱،۲،۳]. دیابت بیماری شایعی می‌باشد که از سالیان بسیار دور شناسایی شده است. در دوران گذشته که روش‌های مدرن درمانی وجود نداشت استراتژی‌های درمان فقط بر گیاهان دارویی استوار بود. گزارش‌های مختلف در مورد اثرات مفید شنبلیله بر هیپوگلیسمی وجود دارد [٤،٥،٦] اما برای سال‌های متمادی معلوم نشده بود که کدامیک از ترکیبات موجود در این گیاه دارای چنین خاصیتی می‌باشد. بنابراین پژوهش‌ها متوجه شناسایی و جداسازی ماده موثره این گیاه گردید. برای اولین بار فودِن[3] و همکاران او یک اسید آمینه غیرطبیعی به نام ٤ - هیدروکسی ایزولوسین[4] را شناسایی نمودند [۷] و سپس آلکوک[5] و همکاران او ساختمان فضایی 4-HILe را معلوم نمودند [۸]. هم اکنون گزارش‌های محدودی از اثرات هیپوگلسمیک 4-HILe به چاپ رسیده است [۹] و به نظر می‌رسد که ماده موثره گیاه شنبلیله در کاهش قند خون 4-HILe می‌باشد. بعضی از محققین که اقدام به جداسازی 4-HILe نموده‌اند مقادیر این ماده در هر صد گرم از دانه خشک شنبلیله را چیزی در حدود ۳۰ mg/100gr - ۹۰ گزارش نموده‌اند [۷،۸،۱۰،۱۱]. در گزارش حاضر ما بر آن بودیم تا:

۱ - مراحل دقیق جداسازی و خالص‌سازی ٤ - هیدروکسی ایزولوسین از دانه شنبلیله را (که از مزارع نقاط مختلف ایران به دست آمده است) به منظور استفاده از آن در آزمایش‌های فارماکولوژیکی در راستای درمان دیابت شناسایی کنیم. ۲ - مقایسه بین محتوای 4-HILe در دانه‌های به دست آمده از دو نقطه ایران با همدیگر و همچنین با گزارش‌های قبلی که در فرانسه صورت گرفته است. به منظور یافتن دانه‌ای با بالاترین مقادیر 4-HIL، ۳- بررسی اثر جوانه‌زدن دانه به همراه یا بدون ایزولوسین به منظور تحصیل بیشترین مقدار از ترکیب فوق تا بدین ترتیب بتوان با کمترین تغییر بیشترین محصول را به دست آورد.

مواد و روش‌ها

مواد

رزین تعویض یونی Amberlit IR (فرم +H) از کمپانی سیگما تهیه شد. ایزولوسین از کمپانی Fluka و کیت اندازه‌گیری اسید آمینه توسط GC از کمپانی Phenomenex تهیه شد.

تهیه دانه شنبلیله

دانه این گیاه از دو نقطه متفاوت در ایران، شمال شرقی (نمونه ۱) و مرکز ایران (نمونه ۲) تهیه شد و توسط هرباریوم دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران شناسایی شد.

جوانه‌زدن دانه گیاه

دانه‌ها در جعبه‌هایی (۵۰ × ۵۰ سانتی‌متر) که با یک لایه اسفنجی پوشیده شده بود در ۲۵ درجه سانتی‌گراد (دمای آزمایشگاه) به مدت ٦ روز کشت می‌شد. لایه اسفنجی با آب شهری مرطوب می‌شد. برای هر نوع دانه دو جعبه در نظر گرفته شد. یکی از جعبه‌ها با آب حاوی ایزولوسین (به مقدار ۱۲۵ میلی‌لیتر با غلظت ۵ mM در هر روز) و دیگری بدون ایزولوسین آبیاری می‌شد.

جداسازی 4-HILe

دانه‌های خشک و یا گیاهک‌های ٦ روزه خرد شد و ۵ بار و در هر بار به مدت ۲٤ ساعت در پترولیوم اتر خیسانده شد تا چربی آن زدوده شود و پس از جداسازی پترولیوم اتر در اتانول ۵۰ درصد در نسبت ۵ ml / ۳ g به مدت ۲٤ ساعت خیسانده

[1] *Trigonella foenum-graecum* L.
[2] *Leguminosae*
[3] Fowden
[4] 4-HILe
[5] Alcock

[Downloaded from jmp.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2010.9.34.8.6]

شد این عمل ۵ بار صورت گرفت و در هر بار عصاره الکلی جمع‌آوری و تحت خلاء تغلیظ شد.

جداسازی آمینو اسید تام

برای این منظور، عصاره الکلی تغلیظ شده از ستون تعویض کاتیونی Amberlit IR 120 (فرم +H) با طول ٤٠ سانتی‌متر و قطر ۲ سانتی‌متر عبور داده شد. شستشوی ستون با استفاده از شیب افزاینده آمونیاک (از ۰/۰۵ N تا ۱ N) انجام گرفت.

تشخیص کمی ٤ هیدروکسی ایزولوسین

تشخیص کمی 4-HILe به وسیله TLC و با استفاده از پلیت‌های سیلکاژل 60 (با ضخامت ۰/۲۵ mm) صورت گرفت. فاز متحرک عبارت بود از n-BuoH / HO-AC/H2O به نسبت ۱ : ۱ : ۳ سپس پلیت‌ها در اون ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه خشک و لکه‌های اسید آمینه به وسیله اسپری نین هیدرین ۰/۱ درصد در استن و سپس انکوباسیون در ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه آشکارسازی شد. لکه‌های 4-HILe به رنگ نارنجی – قرمز دیده می‌شد.

تخلیص 4-HILe

فراکنش‌های به دست آمده از ستون تعویض کاتیونی از ستون حاوی سیلکاژل ٦٠ (Mesh 70-100) با طول ۵۰ cm و قطر ۲/۵ cm عبور داده شد. فراکنش‌های حاوی 4-HILe (که به وسیله TLC شناسایی شده بود) جمع‌آوری شد. برای خالص‌سازی بیشتر فراکنش‌های حاوی 4-HILe به وسیله متانول کریستاله شدند.

سنجش GC

به منظور تشخیص کمی مقادیر 4-HILe در نمونه‌های مختلف از GC استفاده شد. نمونه‌ها عبارت بودند از: عصاره دانه‌ها، عصاره گیاهک‌هایی که با ایزولوسین کشت شده بودند و عصاره گیاهک‌هایی که بدون ایزولوسین کشت شده بودند. آنالیز توسط GC بر اساس رفرانش‌های ۱۳ و ١٤ صورت گرفت. به طور خلاصه، اسید آمینه‌های موجود در نمونه‌ها ابتدا به وسیله ستون کوچکی از Dowex 50 (فرم +H) جداسازی و سپس به وسیله آلکیل کلروفورمات[1] مشتق‌سازی و به ستون GC تزریق شد. یک نمونه خالص شده از 4-HILe به عنوان استاندارد مورد استفاده قرار گرفت.

اسپکتروسکوپی IR , NMR

آنالیز NMR با استفاده از دستگاه MHz NMR ۵۰۰ و با استفاده از محلول (W/V) ۱۰ درصد خالص از 4-HILe در D2O صورت گرفت. اسکپتروسکوپی IR با استفاده از KBr انجام شد.

نتایج

از ۱۰۰ گرم پودر دانه‌های خشک پس از چربی‌زدایی، ۸۰ گرم کیک چربی‌زدایی شده[2] به دست آمد. عصاره اتانولی تحت خلاء تا ۵۰۰ میلی‌لیتر تغلیظ و به ستون تعویض کاتیونی برده شد. ستون به وسیله شیب افزاینده آمونیاک (N ۰/۳ – ۰/۰۵) شستشو شد. شستشوی ستون با غلظت‌های بالاتر از N ۰/۳ از آمونیاک (تا حداکثر N ۱ برای چندین بار) هیچ‌گونه فراکشنی حاوی 4-HILe دیده نشد. فراکنش‌های حاوی 4-HILe مخلوط و به ستون سیلیکاژل برده و ۲۰ فراکشن هرکدام ۱۰۰ میلی‌لیتر جدا شد. فراکشن سوم 4-HILe را با خلوص بیشتری داشت که به منظور خلوص بیشتر به وسیله متانول کریستاله شد که منجر به تولید نمونه خالص از 4-HILe شد. اسپکتروسکوپی NMR و IR به منظور تایید ماده خالص شده انجام شد.

HNMR: در MHz ۵۰۰ و با استفاده از محلول 4-HILe در D2O صورت گرفت. پیک‌ها در δ ۰/۵۹ و۱/۵۲ (دوتایی مربوط به متیل‌های C6 و C5) ۱/۵۸ (مربوط به پروتون C3) ۳/۵۸ (مربوط به پروتون C2 و C4) دیده شد.

اسپکتروسکوپی IR: ۳۱۸۵ cm^{-1} و ۳۳۸۵ =ν (KBr) IR

آنالیز GC: به منظور مقایسه محتوای 4-HILe در دانه‌ها تحت شرایط مختلف (دانه خشک، دانه جوانه‌زده و دانه

[1] Alkyl chloroformate

[2] Deffacted cake

[Downloaded from jmp.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.2717204.2010.9.34.8.6]

جوانه‌زده در مجاورت ایزولوسین) صورت گرفت. بـر اساس اطلاعات بـه دست آمده از GC با جوانـه‌زدن گیاه مخصوصاً اگر جوانـه‌زدن در مجـاورت ایزولوسین صورت گیرد منجر به افزایش مقادیر 4-HILe (افزایش به ترتیب ۲ و ٦ برابری) در هر ۱۰۰ گرم ماده خشک می‌شود. ریز اطلاعات منتج از GC در جدول شماره ۱ آورده شده است.

بحث

مقایسه بین مقادیر 4-HILe در دو نوع دانه شنبلیله از دو نقطه متفاوت در ایران تفاوت چشم‌گیری را نشان نمی‌دهد اما نمونه ۱ دارای مقادیر 4-HILe اندکی بیشتر نسبت به نمونه ۲ می‌باشد (۲۷۹/۳ در مقابل ۲۷٦ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم دانه خشک). این تفاوت شاید به علت تفاوت در آب و هوای منطقه، دسترسی به آب و یا اختلاف در روش آبیاری و یا خشک کردن دانه‌ها باشد.

علاوه بر این، نتایج به دست آمده طی این مطالعه نشان می‌دهد که مقادیر 4-HILe در دانه‌های به دست آمده در ایران (۲۷٦ - ۲۷۹ / ۳ mg / 100 gr) مشابه با مطالعات قبلی می‌باشد که محدوده‌ای بین ۳۰۰ mg/100gr - ۹۰ را گزارش نموده‌اند [۷،۸،۱۰،۱۱]. جوانه‌زدن دانه‌ها به مدت ٦ روز در مقایسه با مقادیر 4-HILe در دانه‌های جوانه نزده باعث افزایش مقادیر 4-HILe به مقدار ۹۰ درصد برای نمونه ۱ و ۳٦/٦ درصد برای نمونه ۲ شد.

به نظر می‌رسد که طی مراحل جوانه‌زدن، آنزیمی که مسؤول تولید 4-HILe است، القاء می‌شود و منجر به افزایش تولید 4-HILe می‌شود، علاوه بر این اضافه نمودن ایزولوسین در هنگام آبیاری دانه‌ها حین جوانه‌زدن، منجر به افزایش شدید 4-HILe (تا حدود ٦ برابر) در مقایسه با جوانه‌هایی که بدون حضور ایزولوسین آبیاری شده‌اند، میشود. (۲۷۹/۳ در مقابل ۱۷۷۹، جدول شماره ۱). به نظر می‌رسد اضافه کردن ایزولوسین باعث افزایش دسترسی آنزیم به سوبسترا[1] و افزایش شدید تولید 4-HILe در مقایسه با جوانه‌هایی که بدون ایزولوسین آبیاری شده‌اند، می‌گردد. مکانیسم احتمالی دیگر، فعال شدن آنزیم تحت تاثیر سوبسترا می‌باشد. نتایج به دست

[1] Substrate availability

جدول شماره ۱- غلظت ٤ هیدروکسی ایزولوسین در نمونه ۱ و ۲ و دانه‌های جوانه‌زده آنها در مجاورت ایزولوسین یابدون آن.

مقادیر 4-Hile در ۱۰۰ گرم از گیاه خشک یا گیاهک (mg)	
۲۷۹/۳	نمونه ۱ تیمار نشده
۵۳۲	نمونه ۱ جوانه زده
۱۷۷۹	نمونه ۱ جوانه زده به همراه ایزولوسین
۲۷۹	نمونه ۲ تیمار نشده
۳٦۹	نمونه ۲ جوانه زده

[Downloaded from jmp.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2010.9.34.8.6]

آمده در این مطالعه به روشنی نشان می‌دهد که دانه‌های شنبلیله که از مزارع نقاط مختلف ایران به دست آمده منبع خوبی برای تهیه 4-HILe می‌باشد مخصوصاً اگر تمهیداتی از جمله جوانه‌زدن گیاه در مجاورت ایزولوسین انجام گیرد. جداسازی انبوه این ماده انجام آزمایش‌های فارماکولوژیکی به منظور معرفی یک داروی جدید در درمان دیابت را تسهیل می‌کند. تخلیص آنزیم مسؤول تولید 4-HILe و تعیین خصوصیات کینتیکی آن عرصه جدیدی را برای به کارگیری آنزیم برای تولید 4-HILe بااستفاده از متدهای بیوتکنولوژیکی فراهم می‌سازد.

منابع

1. Basch E, Ulbricht C, Kuo G, Szapary P, smith M. Therapeutic Applications of fenugreek. *Altern. Med. Rev.* 2003; vol. 8, no.1: 20 – 7.

2. Pavithran K. Fenugreek in diabetes mellitus. *J. Assoc. Physicans India* 1994; 42 (7): 584 - 5.

3. Sharma RD, Raghuram TC, Rao NS. Effects of fenugreek seeds on blood glucose and serum lipids in type I diabetes. *Eur. J. Nutr*. 1990; 44 (4): 301 – 6.

4. Shani J, Goldschmied A, Ahronson Z, Sulman G. Hypoglycaemic effect of *Trigonella foenum-graecum* and lopinus termis (Leguminosae)seeds and their major alkaloids in alloxan diabetic and normal rats. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther*. 1974; 210: 27 – 36.

5. Al-Habori M., and Raman A. Antidiabetic and hypercholestrolaemic effects of fenugreek. *Phytother. Res*. 1998; 12: 233 – 42.

6. Madar Z. Fenugreek (*Trigonella foemen-graecum*) as a mans of reducing postprandial glucose level in diabetic rats. *Nut. Rep. Int.* 1984; 29: 1267 – 73.

7. Fowden L, Pratt HM, Smith A. 4-hydroxyisoleucine from seed of *Trigonella foenum-graecum*. *Phytochem.* 1973; 12: 1707 – 11.

8. Alcock NW, Crout DHG, Gregorio MVM, Lee E, Pike G, Samuel CJ. Stereochemistry of the 4-hydroxyisoleucine from *trigonella foenum-graecum*. *Phytochem*. 1989; 28 (7): 1835 – 41.

9. Broca C, Manteghetti M, Gross R, Baissac Y, Jacob M, Petit P, Sauvaire Y, Ribes G. 4-hydroxyisoleucine:effects of synthetic and natural analogues on insulin secretion. *Eur. J. Pharmacol*. 2000; 390: 339 – 45.

10. Sauvaire Y, Girardon P, Baccou JC, Risterucci AM. Changes in growth and free amino acids of developing seed and pod of fenugreek. *Phytochem*. 1984; 23 (3): 479 – 86.

11. Hardman R, Abu-Al-Futuh IM. The detection of isomers of 4-hydroxyisoleucine by Joel Amino Acid Analyser and by TLC. *Planta Medica*. 1979; 36: 79 – 84.

12. Haefele C, Bonfils C, Sauvaire Y. Characterization of a dioxygenase from *Trigonella foenum-graecum* involved in 4-hydroxyisoleucine biosynthesis. *Phytochem*. 1997; 44 (4): 563 – 6.

13. Husek P. Amino acid derivatization and analysis in five minutes. *FEBES Lett*. 1991; 280: 354 – 6.

14. Husek P. Chloroformate in gas chromatography as general purpose derivatizing agents. *J. Chromatogr. B.* 1998; 717: 57 - 91.

[Downloaded from jmp.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.2717204.2010.9.34.8.6]