

آلکالوئید تریگونلین، یک متابولیت دارویی ارزشمند گیاهی

علی مهرآفرین^۱، نسرین قوامی^۲، حسنعلی نقدی بادی^{۳*}، اردشیر قادری^۴

- ۱- عضو هیأت علمی، گروه پژوهشی کشت و توسعه، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی، کرج
- ۲- دانشجوی دکتری تخصصی باگبانی، گروه پژوهشی کشت و توسعه، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی، کرج
- ۳- دانشیار پژوهش، گروه پژوهشی کشت و توسعه، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی، کرج
- ۴- عضو هیأت علمی، گروه پژوهشی بیوتکنولوژی گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی، کرج

*آدرس مکاتبه: ایران، کرج، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی، صندوق پستی: ۳۶۹ - ۲۱۳۷۵

تلفن: ۰۲۶ (۳۴۷۶۴۰۲۱)، نمبر: ۰۲۶ (۳۴۷۶۴۰۱۰)

پست الکترونیک: Naghdibadi@yahoo.com

تاریخ تصویب: ۹۰/۹/۲

تاریخ دریافت: ۸۹/۱۲/۲۰

چکیده

تریگونلین یک ترکیب آلکالوئیدی است که دارای نقش هورمونی در گیاهان می‌باشد. این متابولیت از طریق متیلاسیون اسید نیکوتینیک در گیاه ساخته می‌شود و در بسیاری از گونه‌های گیاهی از جمله قهقهه، شنبلیله، سویا، نخدود، یونجه و غیره شناسایی شده است. این آلکالوئید دارای خواص دارویی مهمی نظیر ضدسرطان، ضدمیگرن، ضدغفاری کنندگی، پایین آورندگی 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 بسته شدن برگ‌ها در شب برای برخی از گیاهان (شب خسب)، در پاسخ به تنفس‌های اکسیداتیو، تنظیم فشار اسمزی در واکنش به تنفس 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.

گل واژگان: اسید نیکوتینیک، تریگونلین، خواص درمانی، دیابت، متابولیسم گیاهی



مقدمه

آلکالوئید تریگونولین، ...

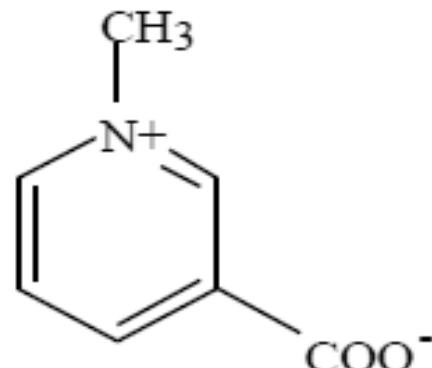
مواد خوراکی متعددی حاوی تریگونولین می‌باشند که قهوه، جو، طالبی، ذرت، پیاز، نخود، سویا، گوجه فرنگی و غیره از آن جمله می‌باشند [۲]. در قهوه فرآوری شده مقدار تریگونولین تا ۱ درصد می‌رسد [۵] و متوسط مقدار تریگونولین در یک فنجان قهوه ۵۳ میلی گرم است [۲,۶].

متابولیت تریگونولین در طی چرخه بیوسنتز نوکلئوتید پیریدین از نیکوتینات، که از مشتقات نوکلئوتیدهای پیریدینی است، ساخته می‌شود. همچنین تریگونولین از نیاسین (ویتامین B₃) ساخته می‌شود و حدود ۵ درصد از نیاسین خوراکی به تریگونولین تبدیل می‌شود [۳]. بنابراین با مصرف ۱۵ میلی گرم (مقدار مجاز مصرف روزانه) نیاسین، حدود ۰/۷۵ میلی گرم تریگونولین تولید می‌شود. لازم به ذکر است، اگرچه نیاسینتین (Niacytin) یک ترکیب فرعی نیاسین در غلات می‌باشد ولی تبدیل به تریگونولین نمی‌شود [۷]. گیاه شنبلیله [۸]، خربزه زمستانی (Benincasa hispida) (Tung-kua-jen) (Abrus kombe) و چشم خروس (Strophantus precatorius) دارای تریگونولین 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 تریگونولین محسوب می‌شوند [۲]. در جدول شماره ۱ تعدادی از گیاهان دارای تریگونولین ذکر شده‌اند.

نام‌های شیمیایی تریگونولین

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

امروزه آلکالوئید دارویی تریگونولین در تعداد زیادی از گیاهان شناسایی شده و در بعضی از خانواده‌های گیاهی مانند Fabaceae, Asteraceae, Lamiaceae دانه‌های گونه‌های گیاهی جنس قهوه (Caffea sp.) به مقدار زیادی یافت می‌شود [۱]. تریگونولین دارای فرمول شیمیایی C₇H₇NO₂ (شکل شماره ۱)، وزن مولکولی ۱۳۷/۱۴، در آب محلول و نقطه ذوب ۲۱۸ درجه سانتی گراد می‌باشد [۲]. تریگونولین برای نخستین بار از گیاه شنبلیله (Trigonella foenum-graceum) گیاهان مختلف و چندین گونه حیوانی نظیر تویا (خار دریایی) و ستاره دریایی و نیز در ادرار پستانداران بعد از استفاده از اسید نیکوتینیک مشاهده شده است [۳].



شکل شماره ۱ - ساختار شیمیایی تریگونولین

با مصرف مواد خوراکی حاوی تریگونولین، این ماده وارد بدن انسان می‌شود. در یک برسی بر روی زنان مورد آزمایش بعد از مصرف ۵۰ میلی گرم (۰/۳۶ میلی مول) تریگونولین خوراکی، ۹ - ۲۰ - ۲۱ درصد آن به صورت تریگونولین و ۳ - ۱۰ درصد به شکل اسید ان - متیل - پیریدون - ۵ - کربوکسیلیک (N'-methyl-2-pyridone-5-carboxylic acid) در ادرار آنها مشاهده شد [۴, ۳].



جدول شماره ۱ - گیاهان دارای تریگونولین [۲]

نام	نام علمی	اندام گیاه	مقدار (ppm)
جو	<i>Hordeum vulgare</i>	بذر	۹
طالبی	<i>Cucumis melo</i>	بذر	۲-۶
قهوه	<i>Coffea arabica</i>	لپه	۳۰۰۰-۱۳۰۰۰
ذرت	<i>C. canephora var. robusta</i>	لپه	۶۰۰۰-۱۳۰۰۰
شنبالیله	<i>C. liberica</i>	لپه	۳۰۰۰-۱۱۰۰۰
پیاز	<i>Zea mays</i>	بذر	۲۴۰۰-۲۵۰۰
نخود فرنگی	<i>Trigonella foenumgraecum</i>	بذر	۱۳۰۰
سویا	<i>Allium cepa</i>	بذر	۱۳
گوجه فرنگی	<i>Pisum sativum</i>	برگ	۱۲۸-۲۲۷
گوجه فرنگی	<i>Glycine max</i>	میوه	۶-۲۰۲
خربزه زمستانی	<i>Lycopersicon esculentum</i>	گیاهچه	۹۱
گوجه فرنگی	<i>Benincasa hispida</i>	برگ	۹-۸۸
گوجه فرنگی	<i>Capparis humilis</i>	ریشه	۱-۷۵
بنگ دانه (ماری جوانا)	<i>Cannabis sativa</i>	اندام هوایی	۵۵
پیریدینیوم هیدروکساید، ۳- کربوکسی - ۱ - متیل پیریدینیوم،		ساقه	۱-۲۴
کوفرین (Coffearine)، جین سین (Gynesine)، جین سیس (Gynesis)، ان - متیل نیکوتینات، اسید ان - متیل نیکوتینات (N'-Methylnicotinic acid)، اسید ان - متیل نیکوتینات بتائین، ان - متیل اسید نیکوتینیک، ان - متیل بتایین اسید نیکوتینیک (Nicotinic acid N-methylbetaine) تریگونولین [۲].		بذر	۱۹/۷-۷۱/۸
		برگ	۱۰/۵-۶۳/۲
		میوه	۳/۷-۱۶/۲
		ساقه	۱/۵-۷/۶
		ریشه	۱/۱
		ریشه	۶۹
		میوه	*
		میوه	*
		برگ	*

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

پراکنش زیست- محیطی

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

پیریدینیوم هیدروکساید، ۳- کربوکسی - ۱ - متیل پیریدینیوم، کوفرین (Coffearine)، جین سین (Gynesine)، جین سیس (Gynesis)، ان - متیل نیکوتینات، اسید ان - متیل نیکوتینات (N'-Methylnicotinic acid)، اسید ان - متیل نیکوتینات بتائین، ان - متیل اسید نیکوتینیک، ان - متیل بتایین اسید نیکوتینیک (Nicotinic acid N-methylbetaine) تریگونولین [۲].



سلول‌های L5178Y TK^{+/−} بافت لنفاوی موش، تریگونولین اثر جهش‌زاوی در مقادیر کمتر از ۷۴۰۰ میکروگرم بر پلیت (۵۴ میکرومول بر پلیت) نداشته است [۱۲].

بیوستز تریگونولین

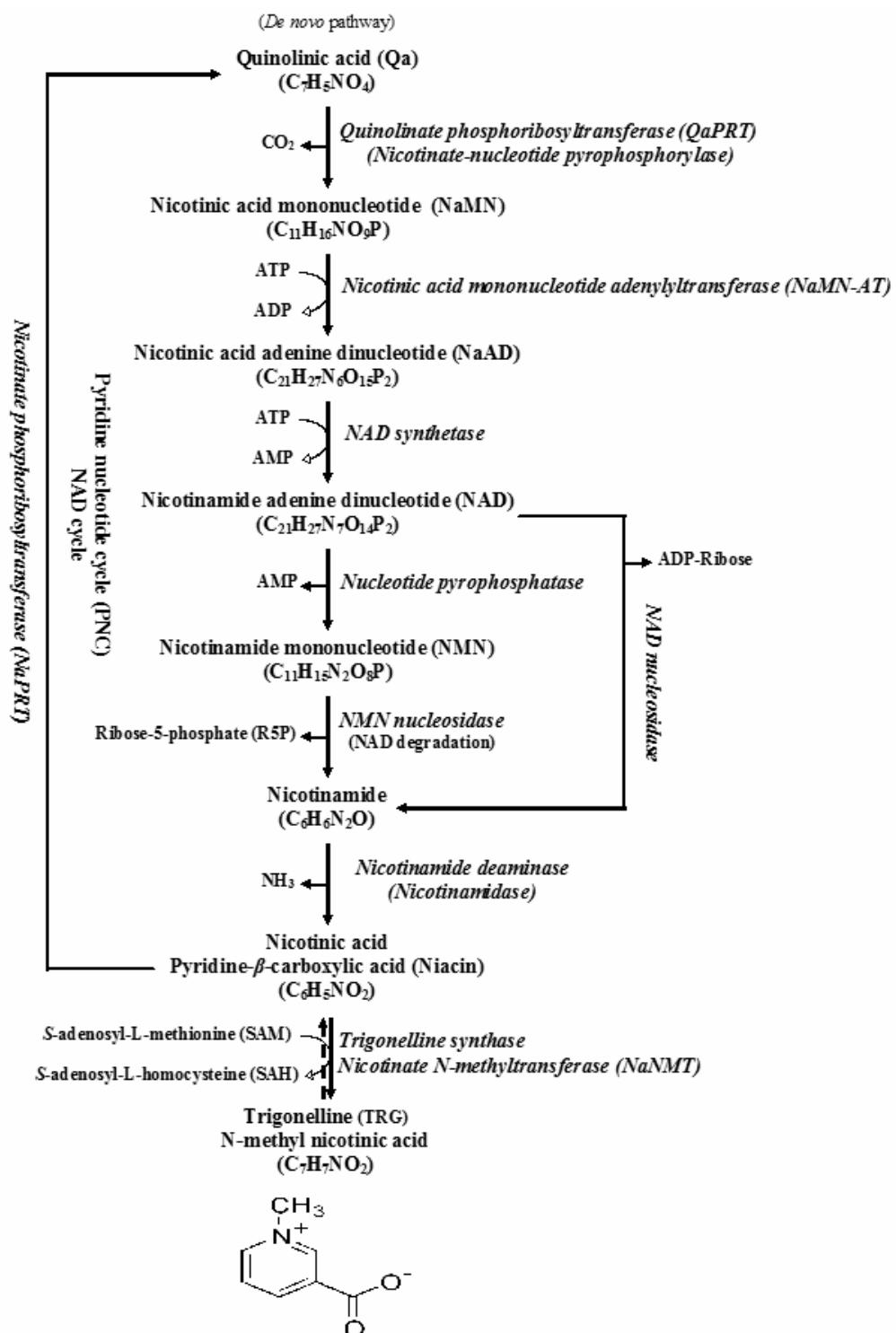
اسید نیکوتینیک، پیش ماده اصلی و اولیه بیوستز تریگونولین در گیاهان است و از سوی دیگر خود محصول تجزیه نیکوتین آمید آدنین دی‌نوكلوتید (NAD) می‌باشد [۱۴]. تریگونولین توسط آنزیم S-adenosyl-L-methionine (SAM) متعلق به ان-متیل‌ترانسферاز نیکوتینات (Nicotinate) (Nmethyltransferase) ساخته می‌شود [۱۵] (شکل شماره ۲). این آنزیم از سلول‌های کشت شده سویا (*Glycine max*) (Lemna paucicostata) در محیط کشت [۱۶] و عدسک آبی (Lemna paucicostata) در محیط کشت عاری از سلول، به دست آمده اما هنوز مطالعه‌ای روی خالص‌سازی آن انجام نشده است [۱۸]. تاکنون ژن تریگونولین سنتتاز از هیچ موجود زنده‌ای توالی‌بابی و همسانه‌سازی (Cloning) نشده است. تریگونولین می‌تواند در گیاه طی یک واکنش برگشتی به اسید نیکوتینیک دمتیله شده و برای ساخت NAD به کار رود (شکل شماره ۲). این عمل در عصاره برگ بعضی از گیاهان نظیر نخود فرنگی دیده شده است [۱۹]. با وجود این که تریگونولین در پریکارپ بیشتر از بذر ساخته می‌شود اما مقدار آن در بذر فراوان‌تر است که نشان می‌دهد مقداری از تریگونولین ساخته شده در پریکارپ به بذر منتقل می‌شود. اما در هنگام جوانه‌زنی به دلیل مصرف تریگونولین مقدار آن در بذر کاهش می‌باید [۱۴]. شیمیزو و مزافرا [۱۹] در تحقیقی، تغییر در مقدار تریگونولین بذر قهوه را در مراحل ابتدایی جوانه‌زنی بررسی کردند و نتیجه گرفتند که در طی

Rutiflorae Rosiflorae Ranunculiflorae Primuliflorae Violiflorae Solaniflorae Santaliflorae تریگونولین همچنین در ستاره دریایی، خار دریایی (توتیا)، عضله سخت پوستان (خانواده خرچنگ) [۱۰]، صدف خوراکی و اسفنج دریایی [۱۱] مشاهده شده است. همچنین در بندپایان، خرزه‌زیان، طناب‌داران، تیره نخ کیسه‌داران (دسته‌ای از مرجان‌ها) و نرم‌تنان نیز وجود دارد [۱۱]. تریگونولین در اندام‌های مختلف بعضی از انواع ماهی‌ها مانند ماهی کولی ژاپنی، شاه ماهی اقیانوس و ساردينی‌های حقیقی [۶] و نیز در پستانداران وجود دارد [۱۱].

قابلیت جهش‌زاوی ژنتیکی تریگونولین در سیستم‌های پروکاریوتیک و یوکاریوتیک

در سیستم‌های پروکاریوتیکی بررسی‌ها نشان داده است که تریگونولین تا غلظت‌های حدود ۱۰۰۰۰ میکروگرم بر پلیت (Plate) ۷۳ میکرومول بر پلیت) در سویه‌های *TA1535*, *TA100*, *TA1538*, *TA98* و *TA1537* باکتری *S. typhimurium* قابلیت جهش‌زاوی ندارد [۱۲] در آزمایشی دیگر، مشخص شد که ۱۰۰۰ میکرومول از تریگونولین به دست آمده (مشابه با شرایط برشته کردن قهوه) در دمای ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه، باعث جهش‌زاوی در نژاد *TA98* باکتری *S. typhimurium* می‌شود. همچنین وقتی تریگونولین در ترکیب با مخلوطی از اسیدهای آمینه (آلانین، آرژنین، سیستئن، لیزین، فنیل‌آلانین، پرولین، سرین، ترئونین و والین) و گلوکن، به مدت ۲۰ دقیقه در معرض دمای ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار می‌گیرد، مواد حاصل از این برهم کنش می‌تواند باعث جهش‌زاوی در سویه‌های *TA98* و *TA1024* باکتری *YG1029* شود اما در دیگر سویه این باکتری (*YG1029*) و در حضور فعالیت متابولیکی آن قابلیت جهش‌زاوی ندارند [۱۳]. در مطالعه بر روی سیستم‌های یوکاریوتیکی مانند





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



جوانهزنی اهمیت دارد. نتایج این تحقیق نشان داد که فعالیت آنزیم تریگونولین ستاز در محور جنینی افزایش و در لپهای کاهش می‌یابد. در نتیجه تریگونولین لپهای به محور جنینی منتقل و مانند دیگر ترکیبات در طی جوانهزنی ذخیره می‌شود. بنابراین تریگونولین به عنوان شکل ذخیره‌ای اسید نیکوتینیک حداقل در طی جوانهزنی عمل می‌کند. تریگونولین اثری روی رشد گیاهچه‌ها ندارد اما اسید نیکوتینیک و نیکوتین آمید بازدارندگی مهمی روی رشد ریشه دارند. بنابراین یکی از دلایل سنتز تریگونولین در گیاهچه‌های ماش، کاهش مقدار زیاد اسید نیکوتینیک و نیکوتین آمیدی است که از چرخه NAD در سلول‌ها رها شده است [۲۴]. نتایج یک تحقیق دیگر نشان داد که تریگونولین در اثر گرمای نیاسین تبدیل می‌شود و مقادیر بالای آن در محور و لپهای 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 تریگونولین قرار گرفته و تغییرات جزیی مشاهده می‌شود. بالاترین میزان تریگونولین در طی روزهای آغازی بعد از جوانهزنی مشاهده شده است. تریگونولین می‌تواند کیفیت غذایی جوانه‌های سویا و لوپن را بهبود دهد [۲۵].

خواص درمانی

تریگونولین یک هورمون گیاهی است که دارای خواص درمانی متعددی از قبیل، ضدسرطان (دهانه رحم و کبد)، ضدمیگرن، ضدغوفونی‌کننده، ضدچربی خون بالا و دیابت می‌باشد [۱، ۲]. بررسی اثر تریگونولین بر روی موش‌ها نشان می‌دهد که این ماده به عنوان آرامیکش عمل می‌کند [۲۶]. به هر حال تریگونولین 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 ۱-۲

جوانهزنی، تریگونولین اباسته شده در بذرها به اسید نیکوتینیک تبدیل شده و برای ساخت NAD استفاده می‌شود. بنابراین، تریگونولین به عنوان مخزن اسید نیکوتینیک در گیاهان عمل می‌کند. بخشی از اسید نیکوتینیک تشکیل شده از تریگونولین در طی مراحل برگشتی بعدی تبدیل به دیگر متابولیت‌ها می‌شود. ویلک و همکاران [۲۰] بیان کردند که واکنش برگشتی اسید نیکوتینیک در کشت سلولی می‌تواند فقط در اسید نیکوتینیک‌هایی که دارای واحدهای قندی می‌باشند، مشاهده گردد که البته این واکنش شامل اسید ۶-هیدروکسی‌نیکوتینیک نمی‌شود. از سوی دیگر هنوز مسیر برگشتی حلقه پیریدین تریگونولین در گیاهان به طور کامل مشخص نیست [۲۱].

تغییرات تریگونولین در طی جوانهزنی بذر

تجمع تریگونولین در بذر بعضی از گیاهان خانواده لگوم نظیر شبدر، شنبه‌لیله، یونجه و ماش دیده شده است. در گیاهچه‌های ماش، مانند بیشتر گیاهان، NAD از هر دو مسیر Salvage و De novo 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 نیکوتینیک تبدیل شده و سپس اسید نیکوتینیک توسط نیکوتین آمیدفسفوریبوزیل ترانسفراز ساخته می‌شود. بررسی تغییرات تریگونولین در گیاه ماش نشان داده است که همانند برگ‌ها و میوه‌های قهوه [۱۴]، چرخه ۶ جزیی نوکلئوتید پیریدین در لپهای و محور جنینی بذرها 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 لپهای کاهش می‌یابد اما نیکوتین آمید موجود در لپهای طی



حاصل از این آزمایش نشان داد که استفاده از تریگونولین 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 تریگونولین به دست آمد. اثر تریگونولین گیاه چشم خروس بر کاهش قند خون از طریق بازدارندگی بر فعالیت آنزیم گلوکز ۶-فسفاتاز و گلیکوژن فسفوریلаз بوده است. تریگونولین 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 تریگونولین 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 عمدۀ متابولیسم گلوکز توسط تریگونولین، می‌تواند نویدبخش تولید دارویی جدید برای درمان دیابت باشد [۳۱].

در تحقیقی دیگر استفاده از تریگونولین 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 تریگونولین افزایش و به تدریج تا دو ساعت بعد کاهش یافت. اما در مقابل آن برای موش‌های شاهدی که تریگونولین دریافت نکردند، سطح انسولین به تدریج بعد از دو ساعت افزایش یافت که نشان می‌دهد تریگونولین می‌تواند باعث بهبود مقاومت به انسولین شود. سطح تری‌گلیسرید سرم و کبد نیز در موش‌هایی که تریگونولین و اسید نیکوتینیک دریافت کردند، پایین‌تر از موش‌های شاهد بود. همچنین در موش‌های دریافت‌کننده تریگونولین و اسید نیکوتینیک، فعالیت برخی از آنزیم‌های کبدی کمتر و فعالیت بیشتر آنزیم کارنیتین پالmitیل ترانسفراز

گرم، ۲-۳ بار در روز استفاده می‌شود [۲]. براساس مطالعات بافت زنده حیوانی، تریگونولین در انسان به عنوان یک ناقل موثر دارو به مغز (مانند فنیل‌اتیل‌آمین (Phenylethylamine) [۲۶]، دوپامین (Dopamine) [۲۷]، دی‌داکسی‌نوکلئوزید (Phentytoin) [۲۸] و فنتی‌سوین (dideoxynucleosides) [۲۹]) و به پوست (مانند اسیکلولوپیر (Acyclovir) [۳۰]) می‌باشد. به طور خلاصه در ذیل خواص درمانی متابولیت تریگونولین به تفکیک اثر بررسی شده است.

اثر ضددیابت

به طور کلی آنزیم گلوکز ۶-فسفاتاز در کبد، گلوکز ۶ فسفات را تجزیه کرده که در نتیجه یک گروه فسفات و یک گلوکز آزاد تولید و سپس گلوکز توسط پروتئین‌های غشاء‌یابی ناقل گلوکز از سلول خارج می‌شود [۳۰]. این واکنش، مرحله نهایی در گلوكونئوژنیز (Gluconeogenesis) (تشکیل قند از مواد غیرقدی) 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 می‌باشد. مطالعات حیوانی در زمینه اثر تریگونولین بر سطح گلوکز خون، نتایج بسیار ارزشمندی را نشان می‌دهد. در یک تحقیق اثر ضد دیابتی آلkalوییدهای گیاه چشم خروس که دارای مقدار زیادی تریگونولین است بر روی خرگوش‌های دیابتی شده با آلوکسان (Alloxan) (دارویی که باعث تخریب گزینشی سلول‌های بتابی 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 تریگونولین استفاده شد و گروه سوم هیچ دارویی دریافت نکردند. نتایج



استروژن گیاهی (فیتواستروژن)

تریگونولین مانند یک سیگناال و نشانگر زیستی عمل می‌کند، به طوری که عملکرد زیستی آن را می‌توان موردنجاش 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 تریگونولین 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 تریگونولین 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 تریگونولین بر روی موش‌های باردار بررسی شد. در روزهای ۷ - ۱ بارداری مقدار ۷۵ میلی گرم بر کیلو گرم تریگونولین به موش‌ها داده شد. سپس در روز دهم لایاتومی 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 تریگونولین ماده‌ای بی‌ضرر در طی بارداری برای موش‌ها می‌باشد [۳۹].

تأثیر بر اعصاب شنوایی

در یک مطالعه هونگ و همکاران [۴۰] گزارش کردند که تریگونولین قهقهه می‌تواند با تغییر آستانه شنوایی و کاهش آسیب اثر بیماری شنوایی- دیابتی، از اختلال شنوایی در بیماران جلوگیری کند. تریگونولین یک ماده بسیار فعال با قدرت باززایی قوی در اعصاب و سیناپس‌ها است. بنابراین به نظر

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

در چندین آزمایش انجام شده درباره سنجش اثر تریگونولین بر سطح گلوکز خون در انسان مشخص شد که مصرف تریگونولین 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 تریگونولین پاسخ اولیه سطوح گلوکز و انسولین را در تست تحمل گلوکز کاهش می‌دهد [۳۳]. اما در تحقیقی دیگر، به موش‌های بزرگ Alloxan-induced diabetes، تریگونولین با دوز ۲۵۰ تا ۱۰۰۰ میلی گرم در کیلو گرم از راه خوراکی داده شد و مشخص شد که تریگونولین اثر ملایم و زودگذری را بر آنها دارد [۳۴].

اثر ضدسرطان

اثر تریگونولین روی تکثیر و تهاجم سلول‌های سرطانی در کشت بافت لاین AH109A سلول‌های سرطانی کبد موش نشان داد که نیاسین و تریگونولین در غلظت‌های ۴۰ - ۲/۵ میکرو گرم، مانع تهاجم سلول‌های سرطانی کبد شده اما بر تکثیر سلول‌ها تأثیری ندارند [۳۵].

اثر ضدمیکروبی

تریگونولین 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 [۳۶]. همچنین تریگونولین بازدارنده رشد باکتری *Streptococcus mutans* می‌باشد که عامل ایجاد پوسیدگی دندان در انسان است [۳۷].



در کشت سوسپانسیون مقدار این آکالالوئید بیشتر خواهد شد. توان تولید بالا در طی واکشت (Subculture) های پی در پی کشت کالوس و سوسپانسیون برای ۸ ماه پایدار می‌ماند و با گذشت زمان تریگونلین در کشت کالوس و سوسپانسیون تجمع می‌یابد [۴۴].

در تحقیقی دیگر از کشت کالوس ۸ هفته‌ای حاصل از بذر شبیله بر روی محیط کشت جامد تغییر یافته تباکو (RT) با ۱ میلی‌گرم در لیتر تو، فوردهی کلروفنوكسی اسید استیک (4-۲، Dichlorophenoxyacetic acid تریگونلین تولید شد. با افزودن ۰/۵ تا ۱ میلی‌گرم اسید نیکوتینیک، مقدار تریگونلین به ترتیب به ۵/۰۱ و ۵/۲۵ درصد افزایش یافت [۴۴]. مقایسه مقدار تریگونلین توسط رادوان و کوکیت [۴۵] 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 کیتین بررسی شدند و مشخص شد که استفاده از اکسین(ها) برای نمو کالوس مناسب‌تر است. انجام شوک‌های هورمونی به مدت ۱ ساعت به طور قابل توجهی توانست رشد کالوس را تحریک کند. با وجود این که استفاده از تو، فور-دی، اسید ایندول استیک، اسید ایندول پروپیونیک، اسید نفتالیک استیک (۱۰ میلی‌گرم در لیتر) باعث افزایش مقدار تریگونلین شد، اما هورمون‌های جیبرلین (۱ میلی‌گرم در لیتر) و کیتین (۲ میلی‌گرم در لیتر) اثرات مشخصی نداشتند. محیط کشت B₅ گامبورگ (Gamborg) که شامل ۲ گرم در لیتر هیدرولیزات کازئین، ۲ گرم در لیتر مخمر و ۴۰ گرم در لیتر ساکارز بود به عنوان محیط رشد استفاده شد. کالوس‌های چهار هفته‌ای شبیله، ۱۵/۶ میلی‌گرم در گرم وزن خشک تریگونلین تولید کرد که ۳-۴ مرتبه بیشتر از بذر و ۱۲-۱۸ مرتبه بیشتر از ریشه‌ها و ساقه‌های گیاهان والد بود. از کشت‌های سوسپانسیون

می‌رسد که تریگونلین ممکن است با باززایی آکسون‌ها و سیناپس‌ها باعث تعدیل بروز فاکتورهای رشد اعصاب در بیماری اعصاب شناوری ناشی از محرک پیرودوکسین شود. غلظت بالای پیرودوکسین یا ویتامین B₆ یکی از عوامل ایجاد بیماری اعصاب شناوری محیطی است. در تحقیقی دیگر روی مدل بیماری اعصاب شناوری 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 شناوری ناشی از پیرودوکسین داشته باشد [۴۰]. تریگونلین همچنین در بهبود تشکیل نرون‌ها در سلول‌های نوروبلاستوما اهمیت فراوان دارد و با باززایی آکسون‌ها و دندربیت‌ها به درمان اختلال حافظه نیز کمک می‌کند [۴۱].

جلوگیری از تجمع بتائین گلایسین در کشت سلولی بافت کلیه در یک آزمایش کشت بافت، استفاده از مقدار زیاد تریگونلین (۲۵۰ میکرومول بر لیتر) در شرایط فشار اسمزی بالای (Hypertonic) محیط کشت، باعث جلوگیری از تجمع بتائین گلایسین $[{\text{CH}_3\text{N}^+}\text{+(CH}_2\text{CO}_2\text{)}_3]$ در سلول‌های کلیه سگ شد [۴۲]. 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 [۲].

تولید تریگونلین در کشت درون شیشه

بررسی عصاره‌های کشت کالوس ریشه شبیله نشان داد که در حضور ATP و کلرید منیزیم، تبدیل اسید نیکوتینیک و اس-آدنوزیل‌متیونین به تریگونلین تسریع می‌شود [۴۳]. کشت کالوس شبیله ۴-۳ مرتبه تریگونلین بیشتری از بذرها و ۱۲-۱۳ مرتبه بیشتر از ریشه‌ها و ساقه‌های این گیاه دارد. همچنین



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 میتوуз 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 معروفی 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 [۴۸] که در ذیل به برخی آنها اشاره می‌شود:

تنظیم چرخه سلولی

ایوانز و همکاران [۴۹] نشان دادند که تریگونلین موجود در پلهای نخود سبز باعث افزایش زمان توقف در مرحله G_2 چرخه سلولی مریستم‌های ریشه و ساقه می‌شود. ثابت شده است که تریگونلین حتی در مقادیر اندازه (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 پلهای 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 میتوуз 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 میلی مول تریگونلین، $2/5$ برابر بلندتر از گیاهان شاهد بود. تریگونلین همچنین باعث افزایش زمان فاز S و چرخه سلولی

۴ و ۶ هفته‌ای به ترتیب $38/2$ و $44/2$ میلی‌گرم در گرم وزن خشک تریگونلین، تولید شد که حدود ۲ برابر کشت کالوس بود. در بستر کشت جامد ۹-۱۲ 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 نیکوتینیک 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 حداقل اسید نیکوتینیک از ۳۱ درصد به 37 درصد افزایش می‌یابد [۴۶]. امروزه در کشت‌های سلولی نگرش جدیدی برای تجمع سریع تر متابولیت‌های ثانویه ارایه می‌شود که با کاهش زمان مورد نیاز برای به دست آوردن کارآیی محصول همراه است. الكل 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 تباکو دارد. در این تحقیق کالوس‌های دوماهه شنبیله با دوزهای مختلف اسید سالیسیلیک در بستر کشت تیمار شدند و نتایج نشان داد که استفاده از اسید سالیسیلیک در محیط کشت سوسپانسیون کالوس‌های شنبیله، باعث افزایش دوباره تولید تریگونلین در دوز $25/0$ میلی‌مول بر لیتر نسبت به شاهد شده است [۴۷].

نقش متابولیکی تریگونلین در گیاهان

اعمال فیزیولوژیکی مختلفی برای تریگونلین در گیاهان ثبت و ارایه شده است، اما درباره بیوسنتز و متابولیسم این



دارد. علاوه بر این حضور همزمان تریگونلین در لگوم میزبان و نیز ژن‌های تجزیه کننده مشابه آن در مگاپلاسمید pSym ریزوپیوم نشان می‌دهد که تریگونلین به عنوان ماده غذایی توسط نژادهای ریزوپیومی (Rhizobial strain) استفاده می‌شود [۵۳]. این خصوصیت ممکن است برای ماندگاری موجودات ریزوسفر، افزایش کارایی الودگی گیاه با باکتری و نیز به عنوان نشانه‌ای در ابتدای مراحل کلونسازی گیاهچه مفید باشد [۵۴]. 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 $1/8$ برابر افزایش می‌یابد. تریگونلین ممکن است عامل تنظیمی در مراحل ابتدایی استقرار قارچ همزیست در گیاه کهور باشد [۵۵].

تنش‌های اکسیداتیو و فرابنفش

برگلاند [۵۶] 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 پلی‌ای‌دی‌پسی‌ریبوز 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. که در این مرحله مصرف می‌شود از NAD تامین می‌شود و برگلاند [۵۶] عقیده دارد که نیکوتین آمید و تریگونلین به عنوان محرك‌های قوی متابولیسم دفاعی در گیاهان، شامل متابولیسم

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 $1/6$ برابر 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 غیرخوشاوند وجود دارد. همچنین مازوکا و همکاران [۵۲] توسط ریدیابی 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 الگوی پروتئینی گیاه 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 ریزوپیوم با فعال کردن پروتئین تنظیمی NodD₂ 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 — باکتری نقش



افزایش ۵ برابری پرولین و ۲ برابری تریگونولین را بعد از القای تنش شوری داشته است. تحقیقات بیشتر برای مقایسه نحوه اثر تریگونولین و تنظیم کننده‌های اسمزی دیگر (مانند پرولین و بتائین گلایسین) بر پارامترهای چرخه سلولی در مریستم‌های بتائین گلایسین) بر پارامترهای چرخه سلولی در مریستم‌های ریشه کشت شده نخودسیز، نشان داد که غلاظت‌های^۴ ۱۰ تا ۷ مول بر لیتر تریگونولین، باعث افزایش مقدار مولکول‌های خاص هسته‌ای در مرحله G₂ می‌شود، در حالی که بتائین گلایسین فقط اندکی در بهبود تجمع این مواد در G₂ مؤثر بوده و پرولین بی‌اثر است. این نتایج ثابت می‌کند که نحوه اثر تریگونولین بر چرخه سلولی محصر به فرد است و تریگونولین می‌تواند نقش تنظیم‌کننده اسمزی را در گیاهان تحت تنش شوری ایفا کند. بررسی میزان تریگونولین گیاه سویا در شرایط تنش شوری نشان داده است که اکثر ژنتوتیپ‌های سویا که در معرض تنش شوری و کم آبی هستند و یا با این شرایط سازگار شده‌اند، مقدار تریگونولین 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 تثیت نیتروژن در شرایط تنش رطوبت، بستگی به مرحله رشد گیاهان دارد. تنش خشکی در طی رشد رویشی، تولید گره و تثیت 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 مسئله بحرانی برای تولید محصول در آینده است. در گیاهان، تریگونولین 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 ریزوپیوم‌ها استفاده شود. فعالیت ریزوپیوم‌های همزیست به گیاهان کمک می‌کند که عملکرد را به ویژه در شرایط آبیاری کامل بهبود دهد. نتایج تحقیقی نشان

گلوتاتیون و تجمع ترکیبات دفاعی ثانویه، به کار می‌روند. کالبین و همکاران [۵۷] پی‌بردنده که اشعه قوی فرابنفش باعث افزایش قابل توجه در مقدار نیکوتین آمید، تریگونولین و گلوتاتیون اکسید شده کل در برگ‌های نخود سبز می‌شود. آنها نتیجه گرفتند که تغییر مقدار تعیین شده نیکوتین آمید و تریگونولین در واکنش به اشعه فرابنفش زمانی رخ می‌دهد که تابش به اندازه کافی تنش زا باشد. به این ترتیب، نیکوتین آمید و متابولیت‌های آن (به خصوص تریگونولین) 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].

متیله کردن DNA

ثبت شده است که اثرات فیزیولوژیکی تریگونولین و دیگر ترکیبات چهارآمونیومی در گیاهان در طی متیله کردن DNA رخ می‌دهد. تریگونولین، کولین و بتائین دارای نقش عمده و فعالی در واکنش‌های متیلاسیون گیاهی می‌باشند [۴۸]. در مورد تریگونولین، برگلاند [۵۶] بیان می‌کند که واکنش آمین‌زادی نیکوتین آمید و تشکیل اسید نیکوتینیک با متیله کردن اسید نیکوتینیک به تریگونولین دنبال می‌شود، و اس-آدنوزیل-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 تریگونولین 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 تریگونولین را در خود جمع می‌کنند تا از هدر رفتان آب گیاه جلوگیری کنند. ترامونتانو و ژوو [۵۸] پی‌بردنده که گیاه یونجه



اشعه فرابنفش شامل روش‌هایی با مشتق‌گیری با-۲-نفتاسیل سولفونات تریفلورومتان یا فنیل ایزوتویوسیانات، HPLC همراه با MS و الکتروفورز موین با تعیین اشعه فرابنفش با استر پسی برموفناسیل کار شده است. این روش‌ها هم برای نمونه‌های گیاهی و هم حیوانی استفاده شده است [۶۰، ۶۱].

برای تعیین و ارزیابی مقدار آکالالوئید تریگونولین به روش اسپکتروفوتومتری 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 صاف کردن، جذب نوری نمونه‌ها را در مقابل نمونه شاهد در طول موج ۲۶۸ نانومتر می‌خوانیم و با استفاده از منحنی استاندارد تریگونولین، مقدار آنرا در نمونه‌های مجھول تعیین می‌کنیم. بر اساس گزارش روش‌های فارماکوپه‌ای طول موج بهینه برای اندازه‌گیری تریگونولین ۲۶۸ نانومتر و برای اندازه‌گیری اسید نیکوتینیک ۲۶۴ نانومتر می‌باشد [۶۰، ۶۱].

امروزه روش HPLC به عنوان روشی رایج، جایگزین روش سنجش اسپکتروفوتومتری 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 تریگونولین، سه گرم از نمونه خشک شده با آب گرم ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت ریفلکس (Reflux is a technique of vapors and the condensation involving 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 ۴/۰ میکرومتر به دستگاه HPLC با ستون C₁₈ تزریق می‌شود. قابل ذکر است که فاز متحرک شامل

داد تنش خشکی در گیاه بادام زمینی سبب افزایش غلظت تریگونولین در ژنوتیپ‌های مختلف بادام زمینی در آبیاری کم در مقایسه با شرایط آبیاری کامل شده است [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، تریگونولین به عنوان یک ماده فعال زیستی برای واکنش شب‌تنجشی از Aeschynomene indica ایزوله شد. بررسی‌ها نشان داد که ۱/۰۱ میکرومول بر لیتر از این ترکیب برای بسته شدن برگ گیاه مذکور در طول روز کافی بود اما در گونه‌های دارای مکانیسم Mimosa pudica حرکت خواب، مانند Cassia mimosoides رقابت می‌کند که در مکانیسم باز شدن برگ مؤثر است. به نظر می‌رسد که تریگونولین ممکن است درگیر در تنظیم فعالیت‌های ساعت بیولوژیکی و ریتم سیرکادین (Circadian rhythm) (ریتم خواب که همراه باز و بسته شدن برگ است) در برخی از گیاهان مانند A. indica باشد [۴۸].

شناسایی، استخراج و سنتز تریگونولین به روش‌های آزمایشگاهی

الف - شناسایی و استخراج تریگونولین به روش HPLC

چندین روش برای استخراج و تعیین مقدار تریگونولین ارائه شده است که بیشتر آنها براساس یک مرحله مشتق‌گیری عمل می‌کنند. مانند اسپکتروفوتومتری اشعه فرابنفش، اسپکتروفوتومتری جرمی، HPTLC با تعیین اشعه فرابنفش، HPLC با تعیین



ج - سنتز به روش اسید سولفات تریگونلین

در یک بالون یک لیتری سه دهانه که مجهز به یک همزن مکانیکی است، ۲۴/۶ گرم اسید نیکوتینیک (۰/۳ مول) و ۲۸ گرم دی متیل سولفات (۰/۳ مول) ریخته و به مدت ۴ ساعت در دمای ۱۳۰ درجه سانتی گراد قرار می دهند. جرم غلیظ به دست آمده را بعد از سرد شدن در ۲۰۰ میلی لیتر آب و ۱ میلی لیتر اسید سولفوریک ۱۰ نرمال حل کرده تا متیل استر تریگونلین هیدروژن سولفات تجزیه شود. این ترکیب تبخیر شده تا شربت غلیظی به حجم ۶۰ میلی لیتر ایجاد شود. به این غلظت ۲۰۰ میلی لیتر الكل داغ اضافه کرده و همراه با ذغال فعال آن را جوشانده تا بی رنگ شود و سپس آن را صاف می کنند. مایع صاف شده را در سرما قرار می دهند تا متبلور شود. سپس ۲۵/۶ گرم از تریگونلین هیدروژن سولفات شود. سپس ۱۰ گرم از تریگونلین هیدروژن سولفات (C₇H₉NO₆S) خالص را صاف کرده و با الكل سرد و اتر شستشو می دهند. با اضافه کردن الكل به محلول مادر (اولیه) ۴/۷ گرم کریستال خالص به دست می آید. نقطه ذوب هر کدام از نمونه ها ۲۰۰ - ۱۹۹ درجه سانتی گراد است. تریگونلین هیدروژن سولفات در آب محلول است و ۱ گرم از آن به آسانی در ۱ میلی لیتر آب حل می شود [۶۲].

تشکر و قدردانی

از همکاری صمیمانه جناب آقای دکتر سعید کیان بخت و سرکار خانم دکتر فرحناز خلیقی سیگارودی قدردانی می شود. این پژوهش با حمایت گروه پژوهشی کشت و توسعه و گروه پژوهشی بیوتکنولوژی پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی در کرج انجام شده است.

اسید کلریدریک ۲ میلی مول بر لیتر آب (pH=3) و سرعت جریان ۱ میلی لیتر بر دقیقه می باشد [۶۱].

برای تهیه استاندارد، پودر آن را پس از اندازه گیری دقیق در ۵ بالن ژوژه جداگانه ریخته و جهت تهیه غلظت های مناسب (۰/۱، ۰/۲، ۰/۵، ۰/۷ و ۱ میلی گرم در میلی لیتر) با آب به حجم رسانده و در ادامه به کمک دستگاه اولتراسونیک کاملاً اتحلال صورت خواهد گرفت و پس از فیلتراسیون با فیلتر میکرونی مخصوص از هر کدام از محلول های به دست آمده ۴ نمونه داخل دستگاه خودکار (Autosampler) تزریق قرار خواهد گرفت. از روی مساحت زیر منحنی به دست آمده بر حسب غلظت، منحنی کالیبراسیون برای نمونه های استاندارد تریگونلین به طور مجزا رسم می شود. سپس از روی فرمول رگرسیون (y=ax+b) مقادیر مجهول در نمونه ها محاسبه می شود [۶۰].

ب- سنتز به روش هیدروکلراید تریگونلین

۱۰ گرم اسید نیکوتینیک و ۱۲ گرم متیل یدید را با ۱۵ میلی لیتر متانول خشک در یک بطری ۳۰۰ میلی لیتری مخلوط کرده و به مدت ۳ ساعت در دمای ۱۵۰ درجه سانتی گراد در اتوکلاو حرارت داده می شود. سپس محصول به دست آمده را در آب حل کرده و مقدار زیادی اکسید نقره آبدار به آن اضافه می شود. مایع حاصل را صاف کرده و با ۷ میلی لیتر اسید کلریدریک غلیظ مخلوط کرده که بعد از تبخیر، یک توده کریستالی آبدار به دست می آید. به این جرم کریستالی، ۳۰۰ میلی لیتر الكل ۹۰ درصد داغ اضافه کرده و یک شب در یخچال قرار می دهند تا کلرید تریگونلین (C₇H₈NO₂Cl) به صورت کریستال جدا شود. رسوب حاصل با الكل سرد و اتر شستشو داده و در نهایت کلرید تریگونلین با نقطه ذوب ۲۵۸-۲۵۹ درجه سانتی گراد حاصل می شود. با تغليظ محلول مادر (اولیه)، ۲ گرم دیگر فرآورده خالص تولید می شود [۶۲].



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-¹⁴C*]nicotinic 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-adenosyl-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,



- 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 Sir₂ 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.** Martinez-Villaluenga C, Kuo Y-H, Lambein F, Frias 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*



- 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 Refereed Research 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 G₂ 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.



- 55.** Rojas-Andrade R, Cerdá-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.

