

## آلکالوئید تریگونلین، یک متابولیت دارویی ارزشمند گیاهی

علی مهرآفرین<sup>۱</sup>، نسرين قوامی<sup>۲</sup>، حسنعلی نقدی بادی<sup>۳\*</sup>، اردشیر قادری<sup>۴</sup>

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  
 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 - ۳۱۳۷۵  
 تلفن: ۰۲۶) ۳۴۷۶۴۰۱۰، نمابر: ۰۲۶) ۳۴۷۶۴۰۲۱  
 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 می باشد. این متابولیت از طریق متیلاسیون اسید نیکوتینیک در گیاه ساخته می شود و در بسیاری از گونه های گیاهی از جمله قهوه، شنبلیله، سویا، نخود، یونجه و غیره شناسایی شده است. این آلکالوئید دارای خواص دارویی مهمی نظیر ضدسرطان، ضدمیگرن، ضدعفونی کنندگی، پایین آورندگی چربی خون و ضددیابت می باشد. چندین مطالعه نشان داده است که تریگونلین با اثر بازدارندگی بر فعالیت آنزیم های اصلی متابولیسم گلوکز، باعث کاهش سطح گلوکز خون می شود. بر این اساس متابولیت تریگونلین می تواند موجب تولید دارویی جدید برای کنترل و درمان دیابت شود. تریگونلین در مکانیسم بسته شدن برگ ها در شب برای برخی از گیاهان (شب خسب)، در پاسخ به تنش های اکسیداتیو، تنظیم فشار اسمزی در واکنش به تنش شوری و خشکی، تنظیم توقف چرخه سلولی گیاه در مرحله  $G_2$  و بیان ژن های محرک تولید گره در ریشه لگوم ها طی فرآیند کلون سازی نقش بسیار مهمی را ایفا می کند.

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



## مقدمه

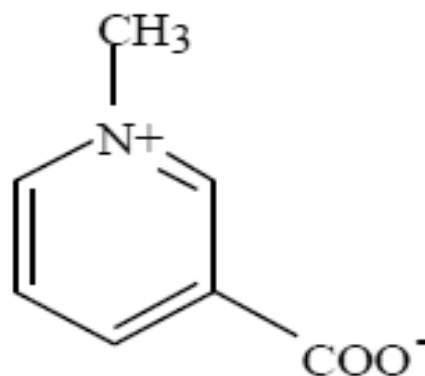
مواد خوراکی متعددی حاوی تريگونلین می‌باشند که قهوه، جو، طالبی، ذرت، پیاز، نخود، سویا، گوجه فرنگی و غیره از آن جمله می‌باشند [۲]. در قهوه فرآوری شده مقدار تريگونلین تا ۱ درصد می‌رسد [۵] و متوسط مقدار تريگونلین در یک فنجان قهوه ۵۳ میلی‌گرم است [۲،۶].

متابولیت تريگونلین در طی چرخه بیوسنتز نوکلئوتید پیریدین از نیکوتینات، که از مشتقات نوکلئوتیدهای پیریدینی است، ساخته می‌شود. همچنین تريگونلین از نیاسین (ویتامین B<sub>3</sub>) ساخته می‌شود و حدود ۵ درصد از نیاسین خوراکی به تريگونلین تبدیل می‌شود [۳]. بنابراین با مصرف ۱۵ میلی‌گرم (مقدار مجاز مصرف روزانه) نیاسین، حدود ۰/۷۵ میلی‌گرم تريگونلین تولید می‌شود. لازم به ذکر است، اگرچه نیاسیتین (Niacytin) یک ترکیب فرعی نیاسین در غلات می‌باشد ولی تبدیل به تريگونلین نمی‌شود [۷]. گیاه شنبلیله [۸]، خربزه زمستانی (Tung-kua-jen) (*Benincasa hispida*) [۹]، استروفانتوس (*Strophantus kombe*) و چشم خروس (*Abrus precatorius*) دارای تريگونلین هستند و برخی از آنها به طور گسترده‌ای به عنوان فرآورده‌های ضد دیابت مورد استفاده قرار می‌گیرند. همچنین مواد خوراکی حاوی شنبلیله نیز مانند ادویه‌ها منبع دیگری از تريگونلین محسوب می‌شوند [۲]. در جدول شماره ۱ تعدادی از گیاهان دارای تريگونلین ذکر شده‌اند.

## نام‌های شیمیایی تريگونلین

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

امروزه آلكالوئید دارویی تريگونلین در تعداد زیادی از گیاهان شناسایی شده و در بعضی از خانواده‌های گیاهی مانند Fabaceae, Asteraceae, Lamiaceae و به ویژه در دانه‌های گونه‌های گیاهی جنس قهوه (*Coffea sp.*) به مقدار زیادی یافت می‌شود [۱]. تريگونلین دارای فرمول شیمیایی C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>2</sub> (شکل شماره ۱)، وزن مولکولی ۱۳۷/۱۴، در آب محلول و نقطه ذوب ۲۱۸ درجه سانتی‌گراد می‌باشد [۲]. تريگونلین 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 نیکوتینیک مشاهده شده است [۳].



شکل شماره ۱- ساختار شیمیایی تريگونلین

با مصرف مواد خوراکی حاوی تريگونلین، این ماده وارد بدن انسان می‌شود. در یک بررسی بر روی زنان مورد آزمایش بعد از مصرف ۵۰ میلی‌گرم (۰/۳۶ میلی‌مول) تريگونلین خوراکی، ۲۱ - ۲۰ درصد آن به صورت تريگونلین 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،۴].



جدول شماره ۱ - گیاهان دارای تریگونلین [۲]

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

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

## پراکنش زیست-محیطی

تریگونلین دارای پراکنش زیادی در زیر تیره گیاهان دولپه می‌باشد و در بذره‌های خشک بعضی گیاهان فوق راسته (یک طبقه در رده‌بندی که بین راسته و رده یا زیر رده قرار دارد).  
 Araliiflorae, Caryophylliflorae, Corniflorae, 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 بتائین اسید نیکوتینیک (*Nicotinic acid N-methylbetaine*)، تریگونلین [۲].



سلول‌های L5178Y TK<sup>+</sup> بافت لنفاوی موش، تریگونلین اثر جهش‌زایی در مقادیر کمتر از ۷۴۰۰ میکروگرم بر پلیت (۵۴ میکرومول بر پلیت) نداشته است [۱۲].

### بیوسنتز تریگونلین

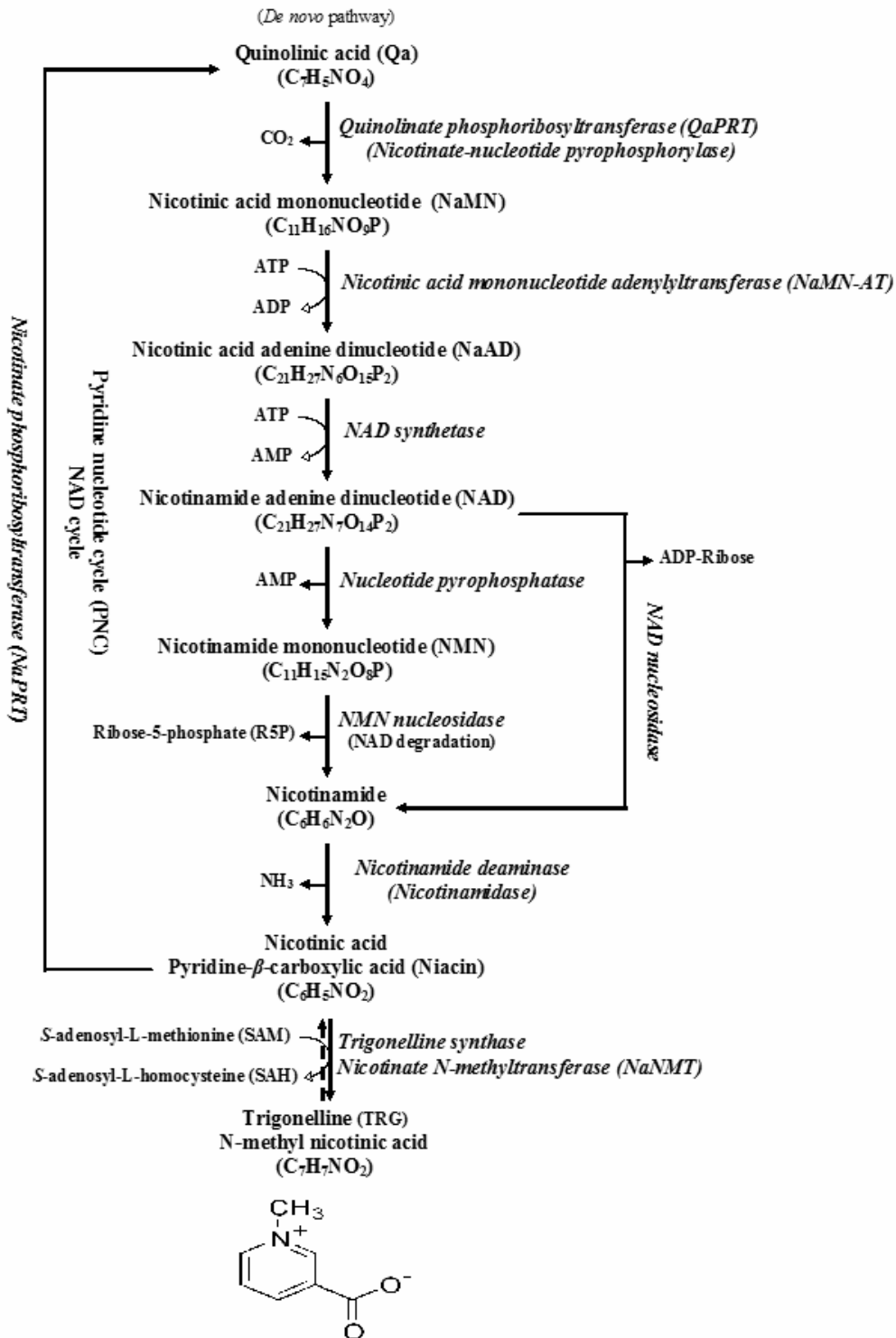
اسید نیکوتینیک، پیش ماده اصلی و اولیه بیوسنتز تریگونلین در گیاهان است و از سوی دیگر خود محصول تجزیه نیکوتین‌آمید آدنین دی‌نوکلئوتید (NAD) می‌باشد [۱۴]. تریگونلین توسط آنزیم اس - آدنوزیل - ال - متیونین (S-adenosyl-L-methionine (SAM)) متعلق به ان-متیل ترانسفراز نیکوتینات (Nicotinate N-methyltransferase) ساخته می‌شود [۱۵] (شکل شماره ۲). این آنزیم از سلول‌های کشت شده سویا (*Glycine max*) [۱۶] و عدسک آبی (*Lemna paucicostata*) در محیط کشت [۱۷] استخراج شده است. اگر چه در گیاه قهوه نیز ان - متیل ترانسفراز نیکوتینات (تریگونلین سنتتاز) در محیط کشت عاری از سلول، به دست آمده اما هنوز مطالعه‌ای روی خالص‌سازی آن انجام نشده است [۱۸]. تاکنون ژن تریگونلین سنتتاز از هیچ موجود زنده‌ای توالی‌یابی و همسانه‌سازی (Cloning) نشده است. تریگونلین 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 تریگونلین در پریکارپ بیشتر از بذر ساخته می‌شود اما مقدار آن در بذر فراوان‌تر است که نشان می‌دهد مقداری از تریگونلین ساخته شده در پریکارپ به بذر منتقل می‌شود. اما در هنگام جوانه‌زنی به دلیل مصرف تریگونلین مقدار آن در بذر کاهش می‌یابد [۱۴]. شیمیزو و مزافرا [۱۹] در تحقیقی، تغییر در مقدار تریگونلین بذر قهوه را در مراحل ابتدایی جوانه‌زنی بررسی کردند و نتیجه گرفتند که در طی

Rutiflorae Rosiflorae Ranunculiflorae Primuliflorae Violiflorae Solaniflorae Santaliflorae وجود دارد [۲]. تریگونلین همچنین در ستاره دریایی، خار دریایی (توتیا)، عضله سخت‌پوستان (خانواده خرچنگ) [۱۰]، صدف خوراکی 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 ماهی کولی ژاپنی، شاه ماهی اقیانوس و ساردین‌های حقیقی [۶] و نیز در پستانداران وجود دارد [۱۱].

### قابلیت جهش‌زایی ژنتیکی تریگونلین در سیستم‌های پروکاریوتیک و یوکاریوتیک

در سیستم‌های پروکاریوتیکی بررسی‌ها نشان داده است که تریگونلین تا غلظت‌های حدود ۱۰۰۰۰ میکروگرم بر پلیت (Plate) (۷۳ میکرومول بر پلیت) در سویه‌های TA1535، TA1537، TA1538، TA98 و TA100 باکتری *Salmonella typhimurium* قابلیت جهش‌زایی ندارد [۱۲]. در آزمایشی دیگر، مشخص شد که ۱۰۰۰ میکرومول از تریگونلین به دست آمده (مشابه با شرایط برشته‌کردن قهوه) در دمای ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه، باعث جهش‌زایی در نژاد TA98 باکتری *S. typhimurium* می‌شود. همچنین وقتی تریگونلین در ترکیب با مخلوطی از اسیدهای آمینه (آلانین، آرژنین، سیستئین، لیزین، فنیل‌آلانین، پرولین، سرین، ترئونین و والین) و گلوکز، به مدت ۲۰ دقیقه در معرض دمای ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار می‌گیرد، مواد حاصل از این برهم‌کنش می‌تواند باعث جهش‌زایی در سویه‌های TA98 و YG1024 باکتری *Salmonella typhimurium* شود اما در دیگر سویه این باکتری (YG1029) و در حضور فعالیت متابولیکی آن قابلیت جهش‌زایی ندارند [۱۳]. در مطالعه بر روی سیستم‌های یوکاریوتیکی مانند





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



جوانه‌زنی، تريگونلین انباشته شده در بذرها به اسيد نيكوتينيك تبديل شده و برای ساخت NAD استفاده می‌شود. بنابراین، تريگونلین به عنوان مخزن اسيد نيكوتينيك در گیاهان عمل می‌کند. بخشی از اسيد نيكوتينيك تشكيل شده از تريگونلین در طی مراحل برگشتی بعدی تبديل به ديگر متابولیت‌ها می‌شود. ویلک و همکاران [۲۰] بیان کردند که واکنش برگشتی اسيد نيكوتينيك در کشت سلولی می‌تواند فقط در اسيد نيكوتينيك‌هایی که دارای واحدهای قندی می‌باشند، مشاهده گردد که البته این واکنش شامل اسيد ۶-هیدروکسی نيكوتينيك نمی‌شود. از سوی ديگر هنوز مسیر برگشتی حلقه پيریدین تريگونلین در گیاهان به طور کامل مشخص نیست [۲۱].

### تغییرات تريگونلین در طی جوانه‌زنی بذر

تجمع تريگونلین در بذر بعضی از گیاهان خانواده لگوم نظیر شبدر، شنبليله، 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 نيكوتین آمید، توسط آنزیم نيكوتین آمید فسفوریبوزیل ترانسفراز دوباره ساخته می‌شود [۲۳]، اما در گیاهچه‌های ماش ابتدا این ماده توسط نيكوتین آمیداز به اسيد نيكوتينيك تبديل شده و سپس اسيد نيكوتينيك توسط نيكوتین آمید فسفوریبوزیل ترانسفراز ساخته می‌شود. بررسی تغییرات تريگونلین در گیاه ماش نشان داده است که همانند برگ‌ها و میوه‌های قهوه [۱۴]، چرخه ۶ جزئی نوکلئوتید پيریدین در لپه‌ها و محور جنینی بذرها در حال جوانه‌زنی گیاه فعال است. اما در این گیاه یک آنزیم ديگر که واکنش تبديل منونوکلئوتید نيكوتین آمید را به نيكوتین آمید ریبوزاید تسريع می‌کند نیز، وجود دارد. بنابراین در گیاهچه‌های ماش چرخه ۷ جزئی نوکلئوتید پيریدین عمل می‌کند. عملکرد این آنزیم‌ها با بلوغ لپه‌ها کاهش می‌یابد اما نيكوتین آمید موجود در لپه‌ها طی

### خواص درمانی

تريگونلین یک هورمون گیاهی است که دارای خواص درمانی متعددی از قبیل، ضدسرطان (دهانه رحم و کبد)، ضد میگرن، ضد عفونی‌کننده، ضد چربی خون بالا و دیابت می‌باشد [۱، ۲]. بررسی اثر تريگونلین بر روی موش‌ها نشان می‌دهد که این ماده به عنوان آرام‌بخش عمل می‌کند [۲۶]. به هر حال تريگونلین 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



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 فنیل اتیل آمین (Phenylethylamine) [۲۶]، دوپامین (Dopamine) [۲]، ۲،۳ دی‌داکسی نوکلئوزید (2,3-dideoxynucleosides) [۲۷] و فنتیوین (Phenytoin) [۲۸] و به پوست (مانند آسیکلوویر (Acyclovir) [۲۹]) می‌باشد. به طور خلاصه در ذیل خواص درمانی متابولیت تریگونلین به تفکیک اثر بررسی شده است.

### اثر ضد دیابت

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 غشایی ناقل گلوکز از سلول خارج می‌شود [۳۰]. این واکنش، مرحله نهایی در گلوکوژنوژنزیز (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 اثر ضد دیابتی آکالوئیدهای 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 ۶- 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 (Extraparaneatic) 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

### 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 ( $\text{pmol/L}$ ,  $p=0.03$ ) 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 [۴۰] 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

(Carnitine palmitoyl transferase) کبد و گلوکوکیناز (Glucokinase) مشاهده شد و به نظر می‌رسد که تنظیم فعالیت این آنزیم‌ها توسط تریگونلین و اسید نیکوتینیک 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 [۳۴].

### 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 ۴۰ - ۲/۵ میکروگرم، مانع تهاجم سلول‌های سرطانی کبد شده اما بر تکثیر سلول‌ها تأثیری ندارند [۳۵].

### اثر ضد میکروبی

تریگونلین خواص ضد میکروبی 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 تریگونلین بازدارنده رشد باکتری *Streptococcus mutans* می‌باشد که عامل ایجاد پوسیدگی دندان در انسان است [۳۷].



در کشت سوسپانسیون مقدار این آلكالوئید بیشتر خواهد شد. توان تولید بالا در طی واكشت (Subculture) های پی در پی كشت كالوس و سوسپانسیون برای ۸ ماه پایدار می ماند و با گذشت زمان تریگونلین در كشت كالوس و سوسپانسیون تجمع می یابد [۴۴].

در تحقیقی دیگر از كشت كالوس ۸ هفته ای حاصل از بذر شنبلیله بر روی محیط كشت جامد تغییر یافته تنباکو (RT) با ۱ میلی گرم در لیتر تو، فوردی کلروفونوكسی اسید استیک (2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid)، مقدار ۴/۵ درصد تریگونلین تولید شد. با افزودن ۰/۵ تا ۱ میلی گرم 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، ریشه ها و سرشاخه ها در كشت بافت آنها انجام شده است. ابتدا ریزنمونه ها در معرض غلظت های 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 كالوس مناسب تر است. انجام شوک های هورمونی به مدت ۱ ساعت به طور قابل توجهی توانست رشد كالوس را تحریک کند. با وجود این که استفاده از تو، فوردی، اسید ایندول استیک، اسید ایندول پروپیونیک، اسید نفتالیک استیک (۱۰ میلی گرم در لیتر) باعث افزایش مقدار تریگونلین شد، اما هورمون های جیبرلین (۱ میلی گرم در لیتر) و کینتین (۲ میلی گرم در لیتر) اثرات مشخصی نداشتند. محیط كشت B<sub>5</sub> گامبورگ (Gamborg) که شامل ۳ گرم در لیتر هیدرولیزات کازئین، ۲ گرم در لیتر مخمر و ۴۰ گرم در لیتر ساکارز بود به عنوان محیط رشد استفاده شد. كالوس های چهار هفته ای شنبلیله، ۱۵/۶ میلی گرم در گرم وزن خشک تریگونلین تولید کرد که ۴-۳ مرتبه بیشتر از بذر و ۱۸-۱۲ مرتبه بیشتر از ریشه ها و ساقه های گیاهان والد بود. از كشت های سوسپانسیون

می رسد که تریگونلین ممکن است با باززایی آكسون ها و سیناپس ها باعث تعدیل بروز فاکتورهای رشد اعصاب در بیماری اعصاب شنوایی ناشی از محرک پیرووکسین شود. غلظت بالای پیریدوکسین یا ویتامین B<sub>6</sub> 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 می تواند تأثیر مثبت بر بهبود بیماری اعصاب شنوایی ناشی از پیریدوکسین داشته باشد [۴۰]. تریگونلین همچنین در بهبود تشکیل نرون ها در سلول های نوروبلاستوما اهمیت فراوان دارد و با باززایی آكسون ها و دندریت ها به درمان اختلال حافظه نیز کمک می کند [۴۱].

#### جلوگیری از تجمع بتائین گلايسين در كشت سلولی بافت کلیه

در یک آزمایش كشت بافت، استفاده از مقدار زیاد تریگونلین (۲۵۰ میکرومول بر لیتر) در شرایط فشار اسمزی بالای (Hypertonic) محیط كشت، باعث جلوگیری از تجمع بتائین گلايسين  $[(CH_3)_3N+CH_2CO_2^-]$  در سلول های کلیه سگ شد [۴۲]. بتائین گلايسين تجمع یافته در بافت داخلی کلیه، برای تنظیم فشار اسمزی بالای محیط در مقابل دنا توره شدن اوره در پستانداران به کار می رود. تریگونلین یک نوع مولکول بتائین است که دارای چهار بخش آمونیوم ( $R_4N^+$ ) و یک بخش کربوکسیلات ( $CO_2^-$ ) است [۲].

#### تولید تریگونلین در كشت درون شیشه

بررسی عصاره های كشت كالوس ریشه شنبلیله نشان داد که در حضور ATP و کلرید منیزیم، تبدیل اسید نیکوتینیک و اس-آدنوزیل متیونین به تریگونلین تسریع می شود [۴۳]. كشت كالوس شنبلیله ۴-۳ مرتبه تریگونلین بیشتری از بذرها و ۱۳-۱۲ مرتبه بیشتر از ریشه ها و ساقه های این گیاه دارد. همچنین



تركيب كمتربحث شده است. اولين بار، تريگونلین (ان-متیل نيكوتین آميد) به دليل اهميت در تأثير بر مرحله  $G_2$  (مرحله‌ای مابين انتهای مرحله سنتز و آغاز مرحله ميتوز در چرخه سلولی است) در چرخه سلولی واقع در نوک ریشه گونه‌های گیاهی مورد توجه زیست‌شناسان قرار گرفت. بیشتر از ۲۰ سال است که تريگونلین به عنوان یک هورمون گیاهی معرفی شده است و تحقیقات بعدی مشخص کرد که اثر تريگونلین تنها به تنظیم چرخه سلولی محدود نمی‌شود و واكنش‌های 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 تريگونلین موجود در لپه‌های نخود سبز باعث افزایش زمان توقف در مرحله  $G_2$  چرخه سلولی مرستم‌های ریشه و ساقه می‌شود. ثابت شده است که تريگونلین حتی در مقادیر اندک ( $10^{-7}$  مول بر لیتر) نیز در این مکانیسم مؤثر می‌باشد. تريگونلین در ابتدای جوانه‌زنی بذرها به قسمت‌های دیگر گیاهچه منتقل می‌شود. این واقعت که تريگونلین منتقل شده می‌تواند جایگزین تريگونلین لپه‌ها در روند توقف  $G_2$  شود و از سوی دیگر نیز ارتباط بین مقدار تريگونلین گیاه با نسبت سلول‌های متوقف شده در  $G_2$ ، نشان می‌دهد که تريگونلین می‌تواند مانند یک هورمون گیاهی عمل کند [۵۰]. مستندات جدیدتر نشان می‌دهد که تريگونلین با اتصال رپلیکون (مرحله‌ای مابين انتهای مرحله سنتز و آغاز مرحله ميتوز 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 تريگونلین، ۲/۵ برابر بلندتر از گیاهان شاهد بود. تريگونلین همچنین باعث افزایش زمان فاز S و چرخه سلولی

۴ و ۶ هفته‌ای به ترتیب ۳۸/۲ و ۴۴/۲ میلی‌گرم در گرم وزن خشک تريگونلین، تولید شد که حدود ۲ برابر کشت کالوس بود. در بستر کشت جامد ۹-۱۲ درصد تريگونلین پخش و در کشت سوسپانسیون حدود یک سوم از تريگونلین در محیط مایع حل شد. بنابراین واضح است که با افزایش خروج این تركيب از محل ساخت آن در سلول‌های درون محیط کشت، مقدار بیشتری از آن ساخته می‌شود. محیط‌های کشت حاوی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر اسید نيكوتینک نسبت به محیط کشت دارای ۱ میلی‌گرم از این ماده زمینه‌ای، دارای مقدار تريگونلین بیشتری بودند. در عین حال، نسبت آلكالوئيد آزاد شده درون محیط کشت مایع با حداقل و حداکثر اسید نيكوتینک از ۳۱ درصد به ۳۷ درصد افزایش می‌یابد [۴۶]. امروزه در کشت‌های سلولی نگرش جدیدی برای تجمع سریع‌تر متابولیت‌های ثانویه ارایه می‌شود که با کاهش زمان مورد نیاز برای به دست آوردن کارایی 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 دو ماهه 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 تريگونلین در دوز ۰/۰۲۵ میلی‌مول بر لیتر نسبت به شاهد شده است [۴۷].

### نقش متابولیکی تريگونلین در گیاهان

اعمال فیزیولوژیکی مختلفی برای تريگونلین 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 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 کارایی آلودگی 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 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 [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 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 [۵۶] عقیده دارد که نیکوتین آمید و تریگونلین به عنوان محرک‌های 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 ۱/۶ 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 غیرخوشبو 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 در سلول 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 تیمار شده 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<sub>2</sub> 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 تريگونلین را بعد از القای تنش شوری داشته است. تحقیقات بیشتر برای مقایسه نحوه اثر تريگونلین و تنظیم کننده‌های اسمزى دیگر (مانند پرولین و بتائین گلايسین) بر پارامترهای چرخه سلولی در مریستم‌های ریشه کشت شده نخودسبز، نشان داد که غلظت‌های  $10^{-4}$  تا  $10^{-7}$  مول بر لیتر تريگونلین، باعث افزایش مقدار مولکول‌های خاص هسته‌ای در مرحله  $G_2$  می‌شود، در حالی‌که بتائین گلايسین فقط اندکی در بهبود تجمع این مواد در  $G_2$  مؤثر بوده و پرولین بی‌اثر است. این نتایج ثابت می‌کند که نحوه اثر تريگونلین بر چرخه سلولی منحصر به فرد است و تريگونلین می‌تواند نقش تنظیم‌کننده اسمزى را در گیاهان تحت تنش شوری ایفا کند. بررسی میزان تريگونلین 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 تريگونلین 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، تريگونلین 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

گلوکاتایون و تجمع ترکیبات دفاعی ثانویه، به کار می‌روند. کالین و همکاران [۵۷] پی‌بردند که اشعه قوی فرابنفش باعث افزایش قابل توجه در مقدار نیکوتین آمید، تريگونلین و گلوکاتایون اکسید شده کل در برگ‌های نخود سبز می‌شود. آنها نتیجه گرفتند که تغییر مقدار تعیین شده نیکوتین آمید و تريگونلین 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 تريگونلین) 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

ثابت شده است که اثرات فیزیولوژیکی تريگونلین و دیگر ترکیبات چهارآمونومی در گیاهان در طی متیله کردن DNA رخ می‌دهد. تريگونلین، کولین و بتائین دارای نقش عمده و فعالی در واکنش‌های متیلاسیون گیاهی می‌باشند [۴۸]. در مورد تريگونلین، برگ‌گلاند [۵۶] بیان می‌کند که واکنش آمین‌زدایی نیکوتین آمید و تشکیل اسید نیکوتینیک با متیله کردن اسید نیکوتینیک به تريگونلین 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 تريگونلین بر روی چرخه سلولی دارد.

### تنش شوری و خشکی

بسیاری از گیاهان در واکنش به مقدار زیاد نمک در محیط، تنظیم‌کننده‌های اسمزى مانند گلايسین بتائین، پرولین و تريگونلین را در خود جمع می‌کنند تا از هدر رفتن آب گیاه جلوگیری کنند. ترامونانو و ژوو [۵۸] پی‌بردند که گیاه یونجه



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

#### واکنش شب‌تنجشی (Nyctinasty) برگ (شب‌خسبی برگ)

در آزمایشگاه دانشگاه یودا (Masahiro Ueda Osaka University) در ژاپن، مطالعات متعددی بر روی عصاره‌های برگ‌های جهت‌تعیین مواد و فاکتورهای مؤثر در مکانیسم تحریک بسته شدن برگ در گونه‌های مختلف گیاهی دارای این مکانیسم انجام شده است. در این راستا، تريگونلین به عنوان یک ماده فعال زیستی برای واکنش شب‌تنجشی از *Aeschynomene indica* ایزوله شد. بررسی‌ها نشان داد که ۰/۱ میکرومول بر لیتر از این ترکیب برای بسته شدن برگ گیاه مذکور در طول روز کافی بود اما در گونه‌های دارای مکانیسم حرکت خواب، مانند *Cassia mimosoides* و *Mimosa pudica* چندان مؤثر نبود. تريگونلین با اسید ایندول استیک رقابت می‌کند که در مکانیسم باز شدن برگ مؤثر است. به نظر می‌رسد که تريگونلین 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 تريگونلین به روش‌های آزمایشگاهی

##### الف - شناسایی و استخراج تريگونلین به روش

##### اسپکتروفتومتری اشعه فرابنفش و HPLC

چندین روش برای استخراج و تعیین مقدار تريگونلین ارائه شده است که بیشتر آنها براساس یک مرحله مشتق‌گیری عمل می‌کنند. مانند اسپکتروفتومتری 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 MS و الکتروفورز موین 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 تريگونلین 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 صاف کردن، جذب نوری نمونه‌ها را در مقابل نمونه شاهد در طول موج ۲۶۸ نانومتر می‌خوانیم و با استفاده از منحنی استاندارد تريگونلین، مقدار آن‌را در نمونه‌های مجهول تعیین می‌کنیم. بر اساس گزارش روش‌های فارماکوپه‌ای طول موج بهینه برای اندازه‌گیری تريگونلین 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 تريگونلین، 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 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 ۰/۴۵ میکرومتر به دستگاه HPLC با ستون C<sub>18</sub> تزریق می‌شود. قابل ذکر است که فاز متحرک شامل

### ج - سنتز به روش اسید سولفات تريگونلین

در یک بالون یک لیتری سه دهانه که مجهز به یک همزن مکانیکی است، ۲۴/۶ گرم اسید نیکوتینیک (۰/۳ مول) و ۳۸ گرم دی‌متیل سولفات (۰/۳ مول) ریخته و به مدت ۴ ساعت در دمای ۱۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار می‌دهند. جرم غلیظ به دست آمده را بعد از سرد شدن در ۲۰۰ میلی‌لیتر آب و ۱ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۱۰ نرمال حل کرده تا متیل استر تريگونلین هیدروژن سولفات تجزیه شود. این ترکیب تبخیر شده تا شربت غلیظی به حجم ۶۰ میلی‌لیتر ایجاد شود. به این غلظت ۲۰۰ میلی‌لیتر الکل داغ اضافه کرده و همراه با ذغال فعال آن را جوشانده تا بی‌رنگ شود و سپس آن را صاف می‌کنند. مایع صاف شده را در سرما قرار می‌دهند تا متبلور شود. سپس ۲۵/۶ گرم از تريگونلین هیدروژن سولفات ( $C_7H_9NO_6S$ ) خالص را صاف کرده و با الکل سرد و اتر شستشو می‌دهند. با اضافه کردن الکل به محلول مادر (اولیه) ۴/۷ گرم کریستال خالص به دست می‌آید. نقطه ذوب هر کدام از نمونه‌ها ۲۰۰ - ۱۹۹ درجه سانتی‌گراد است. تريگونلین هیدروژن سولفات در آب محلول است و ۱ گرم از آن به آسانی در ۱ میلی‌لیتر آب حل می‌شود [۶۲].

### تشکر و قدردانی

از همکاری صمیمانه جناب آقای دکتر سعید کیان‌بخت و سرکار خانم دکتر فرحناز خلیقی‌سیگارودی قدردانی می‌شود. این پژوهش با حمایت گروه پژوهشی کشت و توسعه و گروه پژوهشی بیوتکنولوژی پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی در کرج انجام شده است.

اسید کلریدریک ۲ میلی‌مول بر لیتر آب (pH=3) و سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه می‌باشد [۶۱]. برای تهیه استاندارد، پودر آن را پس از اندازه‌گیری دقیق در ۵ بالن ژوژه جداگانه ریخته و جهت تهیه غلظت‌های مناسب (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 انحلال صورت خواهد گرفت و پس از فیلتراسیون با فیلتر میکرونی مخصوص از هر کدام از محلول‌های به دست آمده ۴ نمونه داخل دستگاه خودکار (Autosampler) تزریق قرار خواهد گرفت. از روی مساحت زیرمنحنی به دست آمده بر حسب غلظت، منحنی کالیبراسیون برای نمونه‌های استاندارد تريگونلین به طور مجزا رسم می‌شود. سپس از روی فرمول رگرسیون ( $y=ax+b$ ) مقادیر مجهول در نمونه‌ها محاسبه می‌شود [۶۰].

### ب- سنتز به روش هیدروکلراید تريگونلین

۱۰ گرم اسید نیکوتینیک و ۱۲ گرم متیل یدید را با ۱۵ میلی‌لیتر متانول خشک در یک بطری ۳۰۰ میلی‌لیتری مخلوط کرده و به مدت ۳ ساعت در دمای ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد در اتوکلاو حرارت داده می‌شود. سپس محصول به دست آمده را در آب حل کرده و مقدار زیادی اکسید نقره آبدار به آن اضافه می‌شود. مایع حاصل را صاف کرده و با ۷ میلی‌لیتر اسید کلریدریک غلیظ مخلوط کرده که بعد از تبخیر، یک توده کریستالی آبدار به دست می‌آید. به این جرم کریستالی، ۳۰۰ میلی‌لیتر الکل ۹۰ درصد داغ اضافه کرده و یک شب در یخچال قرار می‌دهند تا کلرید تريگونلین ( $C_7H_8NO_2Cl$ ) به صورت کریستال جدا شود. رسوب حاصل با الکل سرد و اتر شستشو داده و در نهایت کلرید تريگونلین با نقطه ذوب ۲۵۸-۲۵۹ درجه سانتی‌گراد حاصل می‌شود. با تغلیظ محلول مادر (اولیه)، ۲ گرم دیگر فرآورده خالص تولید می‌شود [۶۲].



1. Qavami N, Mehrafarin A, Naghdi Badi H and Qaderi A. Survey of trigonelline, a secondary metabolite in plants. 1<sup>th</sup> 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*-<sup>14</sup>C]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 the enzyme 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, Neuhaan 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 Sir<sub>2</sub> 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 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<sub>2</sub> 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, 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.

