

(مقاله کوتاه)

بررسی فیتوشیمیایی، آنتی‌اکسیدانی و اثر ضد دیابتیک عصاره برگ‌های گیاه دارویی *Trigonella foenumgraceum* L. در منطقه همدان

سیدمهرداد کسائی^۱، محمدتقی گودرزی^{۲*}، نسیم حیاتی رودباری^۱، پریچهر یغمایی^۱

^۱گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

^۲مرکز تحقیقات مولکولی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۳/۲۳ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۹/۱۹

چکیده

گیاه دارویی شنبلیله (*Trigonella foenumgraceum* L.) علاوه بر مصارف فراوان غذایی، به دلیل سنتز ترکیبات پلی‌فنلی دارای اثر آنتی‌اکسیدان و ضدالتهاب موثر در درمان دیابت است. این تحقیق در سال ۱۳۹۳ با هدف بررسی فیتوشیمیایی، آنتی‌اکسیدانی و ضد دیابتی عصاره آبی برگ‌های شنبلیله انجام گرفت. برگ‌های گیاه از مزرعه گیاهان دارویی همدان تهیه و عصاره آبی آن با استفاده از روش خیساندن استخراج گردید. ارزیابی فیتوشیمیایی (فنل و فلاونوئید کل) در عصاره با استفاده از روش‌های اسپکتروفوتومتری و ارزیابی عملکرد آنتی‌اکسیدانی با استفاده از روش‌های FRAP، شلاته‌کنندگی یون آهن، سنجش میزان تیول و DPPH انجام گرفت. میزان مهار فروکتوزآمین، محصولات نهایی گلاسیکیشن پیشرفته و فراگمانتاسیون آلبومین، به ترتیب با استفاده از روش‌های اسپکتروفوتومتری، اسپکتروفلورومتری و الکتروفورز اندازه‌گیری گردید. نتایج نشان داد که عصاره گیاه دارای میزان فنل کل (۲۳/۸ میلی‌گرم معادل اسیدگالیک در هر گرم وزن نمونه)، فلاونوئید کل (۱۷/۲۹ میلی‌گرم معادل کوئرستین در هر گرم وزن نمونه) و گروه تیول (۰/۲۶ میلی‌مول معادل سیستئین در میلی‌گرم) و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (۰/۳۳ میلی‌مول معادل سولفات آهن در میلی‌گرم) می‌باشد. درصد شلاته‌کنندگی آهن و درصد مهار رادیکال‌های آزاد در این عصاره وابسته به غلظت است. این عصاره در غلظت بالا می‌تواند موجب مهار فروکتوزآمین (۷۹ درصد) و همچنین مهار فراگمانتاسیون شود. از این جهت، عصاره شنبلیله می‌تواند به منظور جلوگیری از عوارض مرتبط با محصولات نهایی گلاسیکیشن پیشرفته AGEs در بیماران دیابتیک به کار رود.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدان، دیابت، شنبلیله، فنل، فلاونوئید، فراگمانتاسیون آلبومین

مقدمه

امروزه مواد غذایی حاوی فلزات واسطه بوده و یا در طول زمان فرایند تولید به آن آلوده می‌شوند. عناصر واسطه‌ای دو ظرفیتی نقش مهمی را به‌عنوان کاتالیزور در فرایندهای اکسیداتیو ایفا نموده و منجر به تشکیل رادیکال‌های هیدروکسیل و واکنش‌های تخریبی هیدروپراکساید می‌شوند. یکی از مکانیسم‌های فعالیت آنتی‌اکسیداتیو شلاته کردن فلزات انتقالی است در حضور عوامل شلاته کننده، تشکیل کمپلکس آهن با فروزین مختل می‌گردد (Mathew and Abraham, 2006). کاهش گروه‌های تیول نیز یکی از مارکرهای آسیب رادیکال‌های آزاد می‌باشد. این عوامل به آسیب اکسیداتیو حساس بوده و در نتیجه این آسیب‌ها کاهش می‌یابند (Chauche et al., 2013).

از آنجایی که فروکتوز آمین از مهمترین عوامل در ایجاد ضایعات عروقی می‌باشد. لذا کاهش آن یک روش درمانی برای به تأخیر انداختن ضایعات عروقی در افراد مبتلا به دیابت می‌باشد و قدرت مهارکنندگی ترکیبات و جلوگیری از تولید فروکتوز آمین، می‌تواند به‌عنوان قدرت ضد دیابتی هر ترکیب محسوب گردد (Meeprom et al., 2013) مودیفیکاسیون پروتئین‌ها توسط گلاکیشن غیر آنزیمی شامل یک سری از واکنش‌های پیچیده است که مجموعاً واکنش‌های مایلارد نامیده می‌شوند که می‌تواند با بالا رفتن مزمن میزان قند خون اهمیت چشمگیری پیدا کند (Arena et al., 2014; Bhattacharjee and Chakraborti, 2013).

گیاهان دارویی و بومی قادرند با سنتز مواد موثره ثانوی و فعال از جمله پلی‌فنل‌ها تحت استرس‌های محیطی در بحث پیشگیری و درمان بیماری‌ها موثر واقع شوند و همچنین قدرت پاک‌کنندگی رادیکال‌های آزاد و شلاته کنندگی فلزات دارند (Subhashini et al., 2011). بنابراین در سال‌های اخیر جایگاه ویژه‌ای در بحث پیشگیری و درمان

از گذشته‌های دور گیاهان دارویی به‌دلیل توانایی تولید متابولیت‌های ثانویه (ترپنویدها، پلی‌فنل‌ها و آلکالوئید) از مهمترین منابع غذایی و دارویی در بحث پیشگیری و درمان بیماری‌های انسان و دام مطرح بوده‌اند (Ghasemi et al., 2011). پلی‌فنول‌ها و فلاونویدهای موجود در عصاره گیاهان به‌عنوان آنتی‌اکسیدان قوی و طبیعی از مهمترین عوامل محدودکننده آسیب‌ها و استرس‌های اکسیداتیو در بدن محسوب می‌شوند که با مهار رادیکال‌های آزاد نقش مهمی را در پیشگیری و درمان بسیاری از بیماری‌های شایع التهابی دارند که امروزه بیشتر مربوط به تغییر شیوه زندگی، افزایش سن و خصوصاً افزایش ارتباط به تشکیل گونه‌های اکسیژنی واکنش‌گر (ROS) و پراکسیداسیون لیپید مربوط است ایفای می‌کنند. به همین دلیل استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی مستخرج از گیاهان دارویی به‌عنوان مواد طبیعی ضدسرطان و ضدالتهاب مورد توجه بیشتری قرار گرفته است (Mazandarani et al., 2011).

رادیکال‌های آزاد به‌دلیل داشتن الکترون آزاد فعال و در نتیجه ناپایدارند گونه‌های ROS شامل آنیون سوپراکسید، رادیکال هیدروکسیل و پراکسید هیدروژن می‌باشد (Nagendrappa, 2005) و تمایل به واکنش با سایر مولکول‌ها دارند و می‌توانند به سلول‌ها و بافت‌ها آسیب برسانند (Nordberg and Arner, 2001). این مولکول‌ها در غلظت‌های بالا موجب ایجاد وضعیتی به نام «استرس اکسیداتیو» می‌گردند. استرس اکسیداتیو در اثر برهم خوردن تعادل بین تولید رادیکال‌های آزاد از یک طرف و سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی از سوی دیگر ایجاد می‌گردد (Nordberg and Arner, 2001). بسیاری از بیماری‌ها نظیر دیابت، سرطان، آترواسکلروز، آرتریت، اختلالات قلبی عروقی، صدمات فیزیکی و پیری، ارتباط اساسی با استرس اکسیداتیو دارند (Subhashini et al., 2011).

مواد و روش‌ها

روش تهیه عصاره: در این تحقیق برگ‌های گیاه شنبلیله از مزرعه گیاهان دارویی همدان جمع‌آوری و عصاره آبی گیاه با استفاده از روش خیساندن برای انجام مطالعات فیتوشیمیایی استخراج گردید، بدین صورت که ۵۰ گرم از این پودر با ۳۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد مخلوط شد و سپس به مدت ۴۸ ساعت بر روی شیکر Shaker و به روش خیساندن در حرارت اتاق قرار داده شد. عصاره حاصل از کاغذ صافی عبور داده شد. محلول به دست آمده در انکوباتور ۴۰ درجه تحت شرایط سترون خشک شد.

بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH: بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره با استفاده از رادیکال پایدار DPPH (Diphenyl-1-picrylhydrazyl) انجام گرفت (Kaviarasan et al., 2007). دی فنیل پیکریل هیدرازیل نوعی رادیکال آزاد پایدار است. ظرفیت عصاره‌های گیاهی در دادن هیدروژن برای پاک کردن DPPH، به‌عنوان میزان توانایی آنتی‌اکسیدان به‌کار می‌رود. ۴ میلی‌لیتر محلول ۰/۱ مولار DPPH در متانول (کنترل) به ۱ میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف عصاره اضافه شده و پس از تکان دادن شدید، به مدت نیم ساعت در اتاق تاریک انکوبه گردید. سپس جذب محلول توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در ۵۱۷ نانومتر قرائت شد. از آنتی‌اکسیدان‌های BHT و اسید آسکوربیک به‌عنوان استاندارد استفاده شد. اثر آنتی‌رادیکالی با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید.

$$RSA\% (\text{radical scavenging activity}) = 100 \times \left[\frac{A_{\text{Control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{Control}}} \right]$$

As جذب کنترل؛ As جذب محلول حاوی عصاره یا استاندارد می‌باشد.

روش سنجش فعالیت شلاته‌کنندگی آهن II: در اندازه‌گیری قدرت شلاته‌کنندگی آهن به روش دنیز، به عصاره، محلول ۲ میلی‌مولار کلرید آهن II و

بیماری‌های شایع انسان و دام قرار گرفته‌اند (Kaneko et al., 2007) و شناسایی سرنخ‌های کلیدی برای انجام مطالعات فیتوشیمیایی، آنتی‌اکسیدانی و بررسی خواص درمانی گیاهان در مهار رادیکال‌های آزاد و پیشگیری و درمان بسیاری از بیماری‌های شایع التهابی روز دنیا از جمله دیابت و کاهش عوارض ناشی از آنها امری ضروری است (Mazandarani et al., 2011) به همین دلیل است که انجام تحقیقات اتونوفارماکولوژیکی، فیتوشیمیایی، آنتی‌اکسیدانی در مورد بررسی خواص آنتی‌دیابتیک افزودنی‌های مواد غذایی، سبزیجات و گیاهان دارویی بومی در رژیم غذایی بسیار مورد توجه محققین قرار گرفته است (Goodarzi et al., 2013).

گیاه شنبلیله با نام علمی *Trigonella foenumgraecum* L. متعلق به تیره حبوبات (Fabaceae) می‌باشد که از میوه و برگ‌های آن به‌عنوان سبزی خوراکی و دارویی استفاده می‌شده است. محل رویش این گیاه در ایران، در مناطق مختلف از جمله آذربایجان، اصفهان، فارس، سمنان و دامغان می‌باشد. گزارش‌ها حکایت از خواص فارماکولوژیک شنبلیله، شامل خواص ضد دیابت، ضد قارچ، ضد چربی، تب‌بری، ضد التهابی و تنظیم‌کننده سیستم ایمنی دارد (Emami and Ahani, 1994; Mirza et al., 2011; Zargari, 2008). با این وجود مکانیسم این تاثیرات و جزئیات فرآیندهای بیوشیمیایی که منتهی به این اثرات می‌شود کاملاً شناخته شده نیست. بنابراین با توجه با استفاده‌های فزاینده این گیاه در تجربیات طب سنتی اغلب کشورها از جمله ایران به‌عنوان کاهش‌دهنده میزان قند خون در افراد دیابتیک، در این پژوهش خواص فیتوشیمیایی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و خاصیت آنتی‌گلاپیکشن عصاره آبی برگ شنبلیله مورد مطالعه قرار گرفته است.

۱۰ دقیقه در بن ماری ۳۷ درجه نگهداری شد. سپس ۱۰ میکرولیتر (۱ میلی گرم) از عصاره را به ۱/۵ میلی لیتر از واکنش گر FRAP افزودیم. ظرفیت آنتی اکسیدان عصاره، مطابق با منحنی حاصل از جذب نوری محلول سریال رقت استاندارد سولفات آهن در ۵۹۳ نانومتر، معادل «میلی مول سولفات آهن» محاسبه شد (Chaouche et al., 2013; Jariyapamornkoon et al., 2013).

روش سنجش مقدار تام فنل: مقادیر فنل کل عصاره به روش رنگ سنجی فولین و سیو-کالتیو Folin-Ciocalteu با اندکی تغییر اندازه گیری شد (Chaouche et al., 2013). بدین منظور ۱۰ میلی گرم از پودر عصاره شنبلیله را در ۱ میلی لیتر آب حل نمودیم. سپس ۱۰۰ میکرولیتر (حاوی ۱ میلی گرم) از آن را به ۲/۸ میلی لیتر آب و ۲ میلی لیتر کربنات سدیم ۲ درصد و ۰/۱ میلی لیتر فولین ۵۰ درصد به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق گذاشته شد و جذب آن را در ۷۵۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر قرائت و معادل میلی گرم اسید گالیک در هر گرم نمونه عصاره، طبق معادله ی خطی منحنی استاندارد محاسبه گردید.

روش سنجش مقدار فلاوونوئید کل: بدین منظور ۱۰ میلی گرم از پودر عصاره را به طور جداگانه در ۵ میلی لیتر آب حل کرده و ۰/۵ میلی لیتر (۱ میلی گرم) از آن را برداشته و با اضافه کردن آن به ۱/۵ میلی لیتر اتانول ۹۵ درصد و ۱۰۰ میکرولیتر از $AlCl_3$ ده درصد و ۱۰۰ میکرولیتر استات پتاسیم ۱ مولار و ۲/۸ میلی لیتر آب، ۴۰ دقیقه در حرارت ۲۰ درجه سانتی گراد انکوبه کرده و سپس جذب آن را در ۴۱۵ نانومتر در دستگاه اسپکتروفوتومتر قرائت نمودیم. نتیجه براساس منحنی استاندارد کوئرستین محاسبه گردید. منحنی استاندارد با قرائت جذب غلظت های سریالی کوئرستین ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱۲ و ۱/۵۶ میلی گرم در لیتر، حاصل می شود (Meda et al., 2005).

محلول ۵ میلی مولار فروزین اضافه شد و پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در دمای محیط، جذب مخلوط در طول موج ۵۶۲ نانومتر اندازه گیری شد. درصد مهار تشکیل کمپلکس آهن-فروزین یا قدرت شلاته کنندگی هر غلظت از عصاره با فرمول زیر معین می شود. از EDTA به عنوان استاندارد استفاده گردید. گروه کنترل، محلول آهن-فروزین می باشد.

$Chelating\ activity\% = 100 \frac{(A_{control} - A_{sample})}{A_{control}}$
 A_c جذب کنترل؛ A_s جذب محلول حاوی عصاره یا استاندارد بود (Mathew and Abraham, 2006).

روش سنجش میزان گروه های تیول: برای اندازه گیری مقدار گروه های تیول، از روش رنگ سنجی DTNB (۲،۲ دی تیو نیتروبنزوئیک اسید) استفاده شد. DNTB با این گروه ها کمپلکس زرد رنگ ایجاد نموده که در طول موج ۴۱۲ نانومتر حداکثر جذب را داراست.

به منظور انجام این آزمایش در روش المان Ellmans، ۱۰ میکرولیتر از عصاره (حاوی ۱ میلی گرم) را با ۹۰ میکرولیتر از DTNB ۵ میلی مولار، ۱۰۰ میلی لیتر PBS، در $pH=7/4$ و در حرارت اتاق به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه نمودیم. سپس جذب محلول حاوی عصاره در ۴۱۲ نانومتر قرائت شد. سطح گروه های تیول توسط منحنی استاندارد L-سیستئین (۰/۵۰ تا ۰/۱۵ میلی مولار) بر اساس میلی مول سیستئین در میلی گرم عصاره، محاسبه گردید (Jariyapamornkoon et al., 2013; Kaviarasan et al., 2007).

روش سنجش ظرفیت تام آنتی اکسیدان TAC: بدین منظور از روش دستی FRAP با اندکی تغییر، استفاده شد. به طور خلاصه، ۱۰ میلی لیتر از محلول بافر ۰/۳ مولار از استات سدیم ($pH=3/6$)، ۱ میلی لیتر ۲، ۴ و ۶-تری پیریدیل S تری آزین (TPTZ) ۱۰ میلی مولار در HCl ۴۰ میلی مولار و ۱ میلی لیتر از $FeCl_3$ ۲۰ میلی مولار مخلوط گردیدند و

این آزمایش با استفاده از دستگاه فلورومتر Jasco FP-6200 و در طول موج‌های ۳۴۰ نانومتر و ۴۴۰ نانومتر به ترتیب برای تحریک و نشر انجام گردید.

روش سنجش میزان مهار فراگمانتاسیون آلبومین: ابتدا آلبومین را با فروکتوز (۲۰۰ میلی‌مولار) و در حضور یون مس (۱۰۰ میکرومولار) مخلوط نموده و پس از تیمار یک هفته‌ای در حضور آمینو گوانیدین و یا عصاره تهیه شده، ترکیب حاصل توسط روش الکتروفورز روی ژل پلی آکریل آمید (SDS-PAGE) مورد بررسی قرار گرفت. الگوی الکتروفورزی حاصل پس از رنگ آمیزی با کوماسی بلو مورد آنالیز قرار گرفت.

آنالیز آماری

در این بررسی نتایج حاصل با سه بار تکرار در مورد هر سنجش گزارش شده است و نمودارها پس از محاسبه میانگین و انحراف معیار ارائه شده‌اند. برای تعیین اختلاف یا عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها از آزمون ANOVA و تست Dunnett توسط نرم‌افزار SPSS version 11 استفاده شد ($P < 0.05$). به‌عنوان سطح معنی‌دار نتایج در نظر گرفته شد.

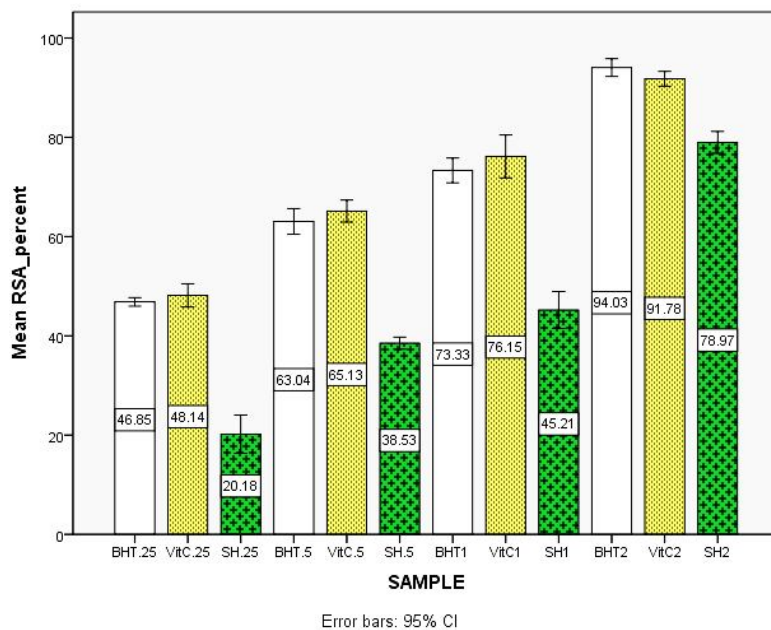
نتایج

نتایج آزمایش سنجش مهار DPPH: در شکل ۱ میزان قدرت پاک‌کنندگی کنندگی رادیکال پایدار DPPH، توسط BHT، ویتامین C و غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره نشان داده شده است. عصاره شنبلیله در غلظت‌های فوق‌الذکر به ترتیب $۰/۸۹ \pm ۰/۱۸$ ، $۰/۲۸ \pm ۰/۵۳$ ، $۰/۸۶ \pm ۰/۲۱$ و $۰/۵۱ \pm ۰/۹۷$ درصد قدرت پاک‌کنندگی DPPH را نشان داد.

روش سنجش میزان مهار فروکتوز آمین: فروکتوز آمین یک محصول آمادوری حاصل از مجاورت قند و پروتئین است و نقش مهمی در ایجاد ضایعات عروقی دارد. بنابراین کاهش فروکتوز آمین یک روش درمانی برای به تأخیر انداختن ضایعات عروقی در افراد مبتلا به دیابت می‌باشد (Caengprasath et al., 2013).

بر اساس مطالعات قبلی، میزان مهار تشکیل آلبومین گلیک (انکوباسیون مخلوط فروکتوز ۰/۲ مولار و آلبومین ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به مدت یک هفته در ۳۷ درجه سانتی‌گراد) توسط غلظت‌های مختلف عصاره با استفاده از رنگ نیتروبلو تترازولیوم NBT (Nitro-Blue-Tetrazolium)، پس از دیالیز جهت خارج نمودن فروکتوز اضافی، اندازه‌گیری شد. به‌طور خلاصه ۱۰ میکرولیتر از محلول‌های گلیک آلبومین، به‌صورت تنها و یا در حضور ۲/۵، ۵، ۱۰ و ۲۰ میکرولیتر (به ترتیب ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) از عصاره، در ۹۰ میکرولیتر از ۰/۵ میلی‌مولار NBT (در بافر کربنات ۰/۱ مولار با pH=۱۰/۴) در حرارت ۳۷ درجه انکوبه شد. جذب ترکیب را پس از قرار دادن در پلیت الایزا، توسط دستگاه الایزا ریدر در ۵۳۰ نانومتر ثبت نمودیم. با مقایسه‌ی جذب نوری آلبومین گلیک بدون حضور و در حضور عصاره‌ها و آمینوگوانیدین (۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) به عنوان یک مهارکننده‌ی استاندارد، میزان مهارکنندگی مشخص شد (Meeprom et al., 2013).

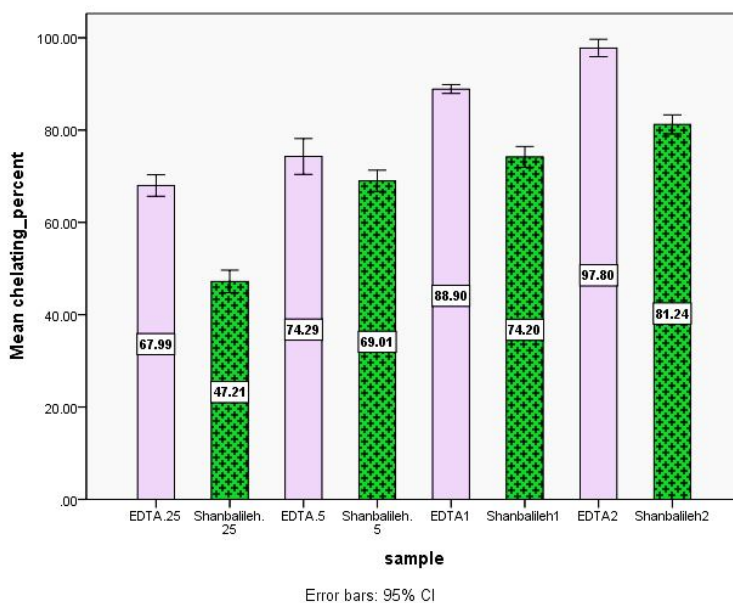
روش سنجش محصولات نهایی گلاسیکیشن پیشرفته: نمونه‌های آلبومین گلیک تهیه شده در مرحله‌ی قبل (در حضور و عدم حضور عصاره در غلظت‌های ذکر شده و همچنین حضور آمینوگوانیدین) جهت سنجش میزان محصول نهایی پیشرفته گلاسیکیشن با روش اسپکتروفلورومتری مورد استفاده قرار گرفت (Arena et al., 2014; Caengprasath et al., 2013;)



شکل ۱: میزان درصد پاک کنندگی رادیکال آزاد DPPH توسط عصاره گیاه در مقایسه با آنتی اکسیدان‌های استاندارد: BHT و ویتامین C در غلظت‌های (۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی گرم در میلی لیتر).
SH: شنبلیله

شنبلیله در غلظت‌های مشابه به ترتیب $۴۷/۲۱ \pm ۰/۵۶۶$ ، $۷۴/۲ \pm ۰/۵۲$ ، $۶۹/۰۱ \pm ۰/۵۳۲$ و $۸۱/۲۳ \pm ۰/۴۸۱$ درصد قدرت شلاته کنندگی داشت که در هر غلظت، نسبت به EDTA کمتر است (شکل ۲).

نتایج آزمایش شلاته کنندگی آهن II: درصد شلاته کنندگی، با استفاده از EDTA به عنوان استاندارد در دوزهای ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی گرم در میلی لیتر به ترتیب برابر با $۶۷/۹۹ \pm ۰/۵۴$ ، $۷۴/۲۸ \pm ۰/۸۹$ ، $۸۸/۹۰ \pm ۰/۲۲$ و $۹۷/۸۰ \pm ۰/۴۴$ درصد بود. عصاره



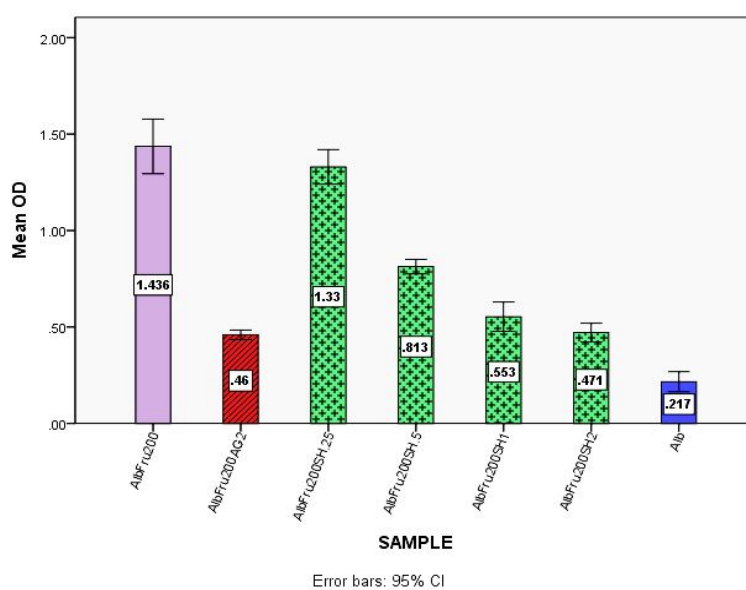
شکل ۲: درصد شلاته کنندگی آهن II. قدرت شلاته کنندگی توسط غلظت‌های مختلف EDTA و شنبلیله.

مقدار فلاونوئید شنبلیله، $17/29 \pm 1/94$ معادل «میلی گرم کوئرستین در هر گرم از عصاره» به دست آمد. نتایج آزمایش تعیین درصد مهار تشکیل فروکتوز آمین: با استفاده از تست Dunnett مشاهده می‌شود میزان OD (جذب نوری) آلبومین گلیکه شده با فروکتوز 200 میلی‌مولار در مقایسه با آلبومین غیر گلیکه $(0/217 \pm 0/012)$ ، افزایش معنی‌داری داشته است (افزایش $84/8$ درصدی). به عبارت دیگر میانگین اختلاف در سطح کمتر از $0/05$ معنی‌دار بوده است (شکل ۳). میزان جذب نوری در غلظت‌های مختلف عصاره، آمینوگوانیدین به‌عنوان استاندارد، آلبومین و آلبومین - فروکتوز در شکل ۳ مشاهده می‌شود. آمینوگوانیدین به‌عنوان یک مهارکننده استاندارد، سبب کاهش $67/96$ درصدی تشکیل فروکتوز آمین شده است، غلظت‌های $0/5$ ، 1 و 2 میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره، به ترتیب $43/3$ ، $61/4$ و $70/9$ درصد مهار تشکیل فروکتوز آمین را نشان داد. عصاره شنبلیله نتوانست در غلظت $0/25$ میلی‌گرم در میلی‌لیتر کاهش معنی‌داری در میزان فروکتوز آمین ایجاد کند.

نتایج آزمایش سنجش میزان گروه‌های تیول: براساس تطبیق میانگین جذب‌های مختلف غلظت‌های متفاوت عصاره شنبلیله با نمودار حاصل از سریال رقت L-سیستئین در مقابل جذب، میزان تیول عصاره شنبلیله، $0/26 \pm 0/05$ معادل «میلی‌مول سیستئین در میلی‌گرم عصاره» تعیین شد.

نتایج آزمایش سنجش ظرفیت تام آنتی‌اکسیدان به روش FRAP: براساس تطبیق میانگین مقدار جذب عصاره شنبلیله با منحنی استاندارد، ظرفیت تام آنتی‌اکسیدان عصاره شنبلیله، $0/33 \pm 0/01$ معادل «میلی‌مول سولفات آهن در میلی‌گرم عصاره» تعیین شد. نتایج آزمایش سنجش مقدار فنل کل: میزان فنل شنبلیله با انتقال میانگین جذب نمونه‌ها بر نمودار استاندارد اسید گالیک، معادل $23/87 \pm 2/93$ میلی‌گرم اسید گالیک در هر گرم از عصاره به دست آمد.

نتایج آزمایش سنجش مقدار فلاونوئید کل: با انطباق میانگین جذب‌های به دست آمده از عصاره بر نمودار حاصل از سریال رقت کوئرستین، میانگین

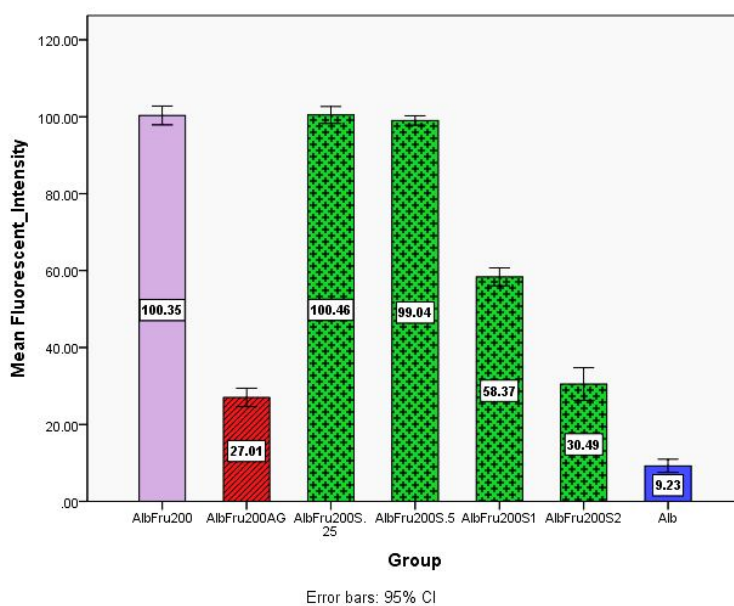


شکل ۳: میزان جذب نوری حاصل از تیمار غلظت‌های مختلف عصاره شنبلیله (SH) و آمینوگوانیدین (AG) با محلول آلبومین - فروکتوز (Alb-Fru).

۶۹/۶ درصد مهار کند و به مقادیر $۵۸/۳۶ \pm ۰/۵۴$ و $۳۰/۴۹ \pm ۰/۹۸$ تقلیل دهد.

آمینوگوانیدین به‌عنوان یک مهارکننده استاندارد در این شرایط، مهار $۷۳/۰۸$ درصدی نشان داد و توانست فلوئورسانس ناشی از تشکیل AGEs را به $۲۷/۰۱ \pm ۰/۵۵$ تقلیل دهد و به‌طور مؤثری از تشکیل آن ممانعت به‌عمل آورد.

نتایج تعیین میزان AGEs: چنانچه در شکل ۴ مشاهده می‌شود، یک هفته پس از انکوباسیون آلبومین با فروکتوز (۲۰۰ میلی‌مولار)، عصاره‌ی شنبلیله در غلظت‌های ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، توانایی مهار تشکیل این محصولات را نشان نداد ($p=۰/۱$) و لیکن در غلظت‌های ۱ و ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، توانست تشکیل AGE را به‌ترتیب $۴۱/۸$ و



شکل ۴: میزان فلوئورسانس حاصل از تشکیل AGEs دو هفته پس از تیمار دوزهای مختلف عصاره شنبلیله (S) و آمینوگوانیدین (AG) با محلول آلبومین-فروکتوز (AlbFru)

آلبومین در حضور فروکتوز می‌کاهد. غلظت‌های ۱۰ و ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از عصاره شنبلیله نیز با توجه به شکل ۵ موجب جلوگیری از پهن شدن باندها و در نتیجه ممانعت از فراگمانتاسیون شدند. چنانچه مشاهده می‌شود، قدرت مهار در غلظت ۱۰ بالاتر از ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از عصاره است.

نتایج الکتروفورز SDS-PAGE آلبومین گلیک: به‌علت اتصال مونوساکاریدهای احیاء کننده به تعداد مختلف به اسیدهای آمینه‌ی با بار مثبت در آلبومین، آلبومین‌های گلیک با اوزان متفاوتی شکل می‌گیرد که در SDS-PAGE به‌صورت باندهای با پهنای متفاوت (به شکل اسمیر) مشاهده می‌گردند. آمینوگوانیدین مانع این اتصالات شده و لذا از فراگمانته شدن



شکل ۵: باند الکتروفورتیک آلبومین A، آلبومین+فروکتوز AlbFru، شنبلیله ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر TFG10، شنبلیله ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر TFG2.

بحث

در حال حاضر مصرف آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی علی‌رغم کارایی و پایداری بالا، ولی به دلیل بروز عوارض جانبی از جمله ایجاد بیماری‌های التهابی مثل دیابت، سرطان و... طی دو دهه اخیر بسیار کاهش یافته است (Huda et al., 2009). بنابراین شناسایی راه‌های موثر در حذف رادیکال‌ها و استرس‌های بیولوژیک از طریق شناسایی آنتی‌اکسیدانهای طبیعی، موثر و کم خطر از گیاهان دارویی پر مصرف در رژیم غذایی بسیار ضروری است (Ghasemi, et al., 2011).

ترکیب‌های ثانوی فنل و فلاونوئید در اکثر اندام‌های گیاهان دارویی از جمله گیاه شنبلیله وجود دارند ولی ماهیت و غلظت آنها متفاوت بوده و بالطبع از عملکردهای متفاوت بیولوژیکی نیز برخوردارند و علاوه بر پتانسیل سازش‌پذیری گیاه به استرس‌های اکولوژیکی (مخصوصاً پتانسیل دفاعی گیاه علیه علفخوار و پاتوژن‌ها)، ایجاد رنگ و طعم در گیاهان، جلب عوامل گرده‌افشان و پراکنش میوه، دارای اثرات مختلف دارویی بوده و از دیرباز در پیشگیری و درمان بیماری‌ها موثر بوده‌اند (Mazandarani et al., 2011). در تأیید موارد فوق نیز نتایج به دست آمده در این تحقیق نشان داد که کثرت میزان بالای ترکیبات فنل و فلاونوئیدهای عصاره گیاه شنبلیله، نقش مهمی در عملکرد آنتی‌اکسیدانی آن داشته است. قدرت پاک‌کنندگی رادیکال آزاد DPPH شنبلیله در غلظت ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، تقریباً با استانداردهای BHT و ویتامین C برابری می‌کند. لذا این گیاه قدرت بالایی در مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد دارد. افزایش قدرت آنتی‌رادیکالی وابسته به غلظت شنبلیله، با مطالعه (Chaouche et al., 2013; Sohrevardi and Sohrevardi, 2012) مطابقت دارد.

افزایش قدرت شلاته‌کنندگی یون فرو، با افزایش غلظت عصاره شنبلیله افزایش می‌یابد. این نتیجه با نتیجه حاصل از پژوهش (Subhashini et al., 2011) مطابقت دارد. نتایج آزمایش‌های آنتی‌اکسیدانی دلالت بر این دارد که عصاره آبی برگ شنبلیله، خواص آنتی‌اکسیدانی وابسته به غلظت دارد که به ترکیبات فنلی آن مرتبط است. این موضوع با مطالعات سو‌باشین و همکاران (Subhashini et al., 2011; Asadi et al., 2014) در هر دو محیط آزمایشگاهی و جاندار، منطبق است.

در سنجش درصد مهار فروکتوزآمین، میزان OD آلبومین گلیکه شده با فروکتوز ۲۰۰ میلی‌مولار در مقایسه با آلبومین غیر گلیکه، افزایش معنی‌داری داشته است (افزایش ۸۴/۸ درصدی). آمینوگوانیدین به عنوان یک مهارکننده استاندارد، سبب کاهش ۶۷/۹۶ درصدی در میزان فروکتوزآمین شده است، در حالی که فقط غلظت‌های بالاتر عصاره توانایی مهار قابل‌قیاس با این مهارکننده را دارند. براساس نتایج حاصله عصاره شنبلیله در غلظت‌های پایین، توانایی مهار تشکیل AGEs را ندارد؛ لیکن در غلظت‌های ۱ و ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، می‌تواند تشکیل این محصولات را به ترتیب ۴۱/۸ و ۶۹/۶ درصد (در مقایسه با آمینوگوانیدین به عنوان مهارکننده استاندارد) مهار کند و به مقادیر $54 \pm 0.58/36$ و $98 \pm 0.30/49$ تقلیل دهد. لذا در این غلظت‌ها دارای آثار آنتی‌دیابتی می‌باشد. این یافته‌ها با یافته‌های حاصل از پژوهش مادار و همکاران (Madar et al., 1998) همخوانی دارد. تحقیقاتی که توسط شارما و همکاران (Sharma et al., 1996) بر روی بیماران دیابتی صورت گرفته و هموگلوبین، پروتئین مورد مطالعه بوده که پس از ۸ هفته مصرف خوراکی پودر شنبلیله، هموگلوبین گلیکوزیله به مقدار چشمگیری کاهش یافته است.

یکسان انجام گرفته تا نتایج بتواند مورد استفاده ی شرکت های تولید داروهای گیاهی قرار گیرد و از این سرمایه های عظیم طبیعی استفاده بهتر گردد.

سپاسگزاری

این مقاله از رساله دکتری بیوشیمی در دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران استخراج شده است و با حمایت مالی این دانشگاه انجام پذیرفته است که موجب نهایت امتنان است. از سرکار خانم دکتر معصومه مازندرانی و دکتر اصغر سیف، به خاطر راهنمایی های بسیار، سپاسگزاریم. همچنین از آقای ابراهیم عباسی عشاقی جهت همکاری و راهنمایی در تکنیک ها تشکر می نمایم.

References

1. Emami, A., Ahani A. 2008. Medicinal Botany. Medical science of Iran University Press. Tehran, Iran. 514.
2. Mirzaei, A., Mohammadi J., Mirzaei, M. 2011. Antioxidant activity and phenolic content of hydroalcoholic extract of *Sisimbrion*, *Plantago*, *Corianderum* and *Trigonella*. Fassa Medical science University Journal. 3(2): 160-167.
3. Zargari, A. 1993. Medicinal plants (3th volume). Tehran University Press. Tehran, Iran.
4. Huda-Faujan, N., Norriham, A., Norrakiah, A. and Babji, A. (2009). Antioxidant activity of plants methanolic extracts containing phenolic compounds. African Journal of Biotechnology, 8: 484-489.
5. Nordberg, J.L., Arnér, E.S. 2001. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. Free Radic Biol Med. 31(11):1 287-312.
6. Arena, S.I., Salzano, A.M., Renzone, G., D'Ambrosio, C., Scaloni, A. 2014. Non-enzymatic glycation and glycoxidation protein products in foods and diseases: an interconnected, complex scenario fully open to innovative

نتایج این تحقیق نیز علی رغم تفاوت محیط مطالعه، با تحقیق حاضر تطابق دارد.

در بررسی اثر مهاری عصاره شنبلیله بر فراگمانتاسیون پروتئین چنانچه در الگوی الکتروفورزی مشخص است، عصاره ی شنبلیله می تواند مانع فراگمانتاسیون آلبومین بر اثر تشکیل فروکتوز آمین گردد. به عبارت دیگر مانع صدمات ناشی از این پدیده بر پروتئین ها گردد و از عوارض دیابت جلوگیری می کند که این اثر در غلظت های بالا بارزتر است و با نتایج پژوهش های (Wijetunge and Perera, 2014) منطبق است. در این مطالعه غلظت های مختلف قندهای مختلف در شرایط آزمایشگاهی متفاوت مورد مطالعه قرار گرفته اند و بر عدم تأثیر آمینوگوانیدین بر مهاجرت آلبومین در غیاب قند و تأثیر آن بر مهاجرت آلبومین در حضور قند تأکید شده است. همچنین بر تأثیر بیشتر فروکتوز نسبت به گلوکز بر گلیکته شدن پروتئین ها تأکید دارد. در مطالعه گودرزی و همکاران در سال ۲۰۱۳ اثرات عصاره شنبلیله بر کاهش گلوکز خون در رت های دیابتی نوع ۲ نشان داده شده است و این تاثیر را ناشی از بهبود شرایط مقاوت به انسولین دانسته اند (Goodarzi et al., 2013; Hebschmann et al.,) (2006).

نتیجه گیری نهایی

گیاه شنبلیله دارای خواص آنتی اکسیدانی، آنتی اکسیدانی و ضد دیابتیکی است و می توان آن را به عنوان روشی کمکی در پیشگیری از بیماری های ناشی از استرس اکسیداتیو و به ویژه جلوگیری از عوارض وخیم دیابت شیرین، به طور خوراکی مورد استفاده قرار داد. پیشنهاد می گردد که تمامی روش های یاد شده بر روی یکایک اجزاء موجود در عصاره این گیاه در محیط آزمایشگاهی و جاندار در شرایط

- proteomic studies. *Mass Spectrom Rev.* 33(1):49-77.
7. Asadi, S., Sohrabi, M., Zarei, S., Ghyasvand, T., Rezaei Farimani, A., Goodarzi, M. 2014. Effects of *Curcuma Longa* and *Cinnamon* aqueous extracts on serum carbohydrates and lipids metabolism and oxidative status in high fructose fed rats. *International Research Journal of Biological Sciences*, 3(3): 78-82.
 8. Bhattacharjee, A. and Chakraborti, A. 2013. Inhibitory Effect of Piper betle Linn. Leaf extract on protein glycation-quantification and characterization of the antiglycation components. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 50: 529-536.
 9. Caengprasath, N., Ngamukote, S., Mäkynen, K. and Adisakwattana, S. (2013). The protective effect of pomelo extract (*citrus grandis* L. osbeck) against fructose mediated protein oxidation and glycation. *Excli Journal*, 12: 491-502.
 10. Chaouche, T., Haddouchi, F., Ksouri, R., Medini, F., El-Haci, I., Boucherit, Z. 2013. Antioxidant activity profiling by spectrophotometric methods of phenolic extract of *Prasium majus* L. *Free Radicals and Antioxidants*, 3: 43-46.
 11. Ghasemi, K., Ghasemi, Y., Ehteshamnia, A., Nabavi, F., Ebrahimzadeh, A., and Pourmand, F. (2011). Influence of environmental factors on antioxidant activity, phenol and flavonoid content of walnut. *J. Med. Plants Res.* 5 (7): 1128-1133.
 12. Goodarzi, M., Tootoonchi, A., Karimi, J., Abbasi Oshaghi, E. 2013. Anti-diabetic effects of aqueous extracts of three iranian medicinal plants in type 2 diabetic rats induced by high fructose diet. *Avicenna Journal of Medical Biochemistry*, 1(1): 7-13.
 13. Hebschmann, A., Regensteiner, J., Vlassara, H. and Reusch, J. 2006. Diabetes and advanced glycoxidation end products. *Diabetes Care*, 29: 1420-1432.
 14. Jariyapamornkoon, N., Yibchok-anun, S., Adisakwattana, S. 2013. Inhibition of advanced glycation end products by red grape skin extract and its antioxidant activity. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13: 13-17.
 15. Kaneko, T., Tahara, S., Takayabashi, F. 2007. Inhibitory effect of natural coumarin compounds, esculetin and esculin, on oxidative DNA damage and formation of aberrant crypt foci and tumors induced by 1,2-dimethylhydrazine in rat colons. *Bio. Pharm Bull.*, 30: 2052-2057.
 16. Kaviarasan, S., Naik, G., Gangabagirathi, R., Anuradha, C., Priyadarsini, K. 2007. In vitro studies on antiradical and antioxidant activities of fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) seeds. *Food Chemistry*, 103: 31-37.
 17. Madar, Z., Abel, R., Samish, S., Arda, J. 1998. Glucose-lowering effect of fenugreek in non insulin dependent diabetics. *European Journal of Clinical Nutrition*, 42(1): 51-54.
 18. Mathew, S., Abraham, T. 2006. Studies on the antioxidant activities of cinnamon (*Cinnamomum verum*) bark extracts, through various in vitro models. *Food Chemistry*, 94: 520-528.
 19. Mazandarani, M., Makri, S., Bajjan, G. 2011. Evaluation of phytochemical and antioxidant activity in different parts of *Heracleumgor ganicumrech* F. in golestan province, north of Iran. *Iranian Journal Plant Physiology*, 2(2): 381-388.
 20. Meda, A., Lamien, C., Romito, M., Millogo, J., Nacoulma, O. 2005. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry*, 91: 571-577.
 21. Meeprom, A., Sompong, W., Chan, C., Adisakwattana, S. 2013. Isoferulic acid, a new anti-glycation agent, inhibits fructose and glucose-mediated protein glycation in vitro. *Molecules*, 18: 6439-6454.
 22. Nagendrappa, C. 2005. An appreciation of free radical chemistry- 3 free radicals in diseases and health. *Resonance*, 10(3): 67-73.
 23. Sharma, R., Sarkar, A., Hazara, D., Mishra, B., Singh, J., Sharma, S. 1996. Use of fenugreek seed powder in the management of non-insulin dependent

- diabetes mellitus. *Nutrition Research*, 16(8): 1331-1339.
24. Sohrevardi, N. and Sohrevardi, F. 2012. Essential oil composition and antioxidant activity of trigonella *Foenum Graecum* L. plant. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, 4(12): 793-797.
25. Subhashini, N., Thangathirupathi, A., Lavanya, N. 2011. Antioxidant activity of trigonella foenum graecum using various In vitro and ex vivo models. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3(2): 96-102.
26. Wijetunge, D., Perera, H. 2014. A novel in vitro method to identify protein glycation inhibitors. *Asian Journal of Medical Sciences*, 5(3): 15-21.