فصلنامه (علمی – پژوهشی)

زیست شناسی تکوینی

سال دهم، شماره ۲، بهار ۱۳۹۷

بررسی آزمایشگاهی آثار آنتی‌اکسیدانی، آنتی‌رادیکالی و آنتی‌دیابتیک و ممانعت از تشکیل محصولات نهایی حاصل گلیکیشن پیشرفته توسط دارچین

سید مهرداد کسائی[۱*]، سیده نگین کسائی[۲]

[۱] گروه بیوشیمی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد همدان، همدان، ایران

[۲] دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

[*] E-mail: kassaee2001@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۲/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۳/۰۱

چکیده

امروزه گیاهان دارویی به خاطر نقشی که در پیشگیری و درمان بسیاری از بیماری‌ها دارند، مورد توجه قرار گرفته‌اند. هدف از این مطالعه، ارزیابی آزمایشگاهی خواص آنتی‌اکسیدان و ضددیابتی‌دیابتیک گیاه دارچین می‌باشد. عصاره‌ی آبی دارچین با روش خیساندن تهیه شد. غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از عصاره فراهم گشت. خواص فیتوشیمیایی دارچین با اندازه‌گیری فنل، فلاوونوئید، ظرفیت تام آنتی‌اکسیدان، قدرت پاک کنندگی رادیکال، توانایی کلاته کردن فلز و اندازه‌گیری گروه‌های تیول معین شد. فعالیت آنتی‌دیابتیک نیز توسط توانایی مهار تشکیل فروکتوز آمین و محصولات پیشرفته حاصل از قندی شدن به ترتیب توسط اسپکتروفوتومتری و اسپکتروفلورومتری سنجیده شد. توانایی عصاره در فراگمانتاسیون آلبومین گلیکه با SDS-PAGE سنجیده شد. مقدار فنل و فلاوونوئید توسط روش‌های استاندارد اندازه گرفته شد. داده‌ها با ANNOVA یکطرفه و با نرم‌افزار SPSS آنالیز شد. مقدار فنل دارچین ۳۱/۳۴ ±۱/۸۳mg GAE/g و مقدار فلاوونوئید آن ۱/۳۷mg QE/g ± ۱۹/۸۹ معین شد. در همه روش‌ها، فعالیت‌های آنتی‌اکسیدان و آنتی رادیکالی دارچین، به صورت وابسته به غلظت تایید شد. این گیاه دارای خاصیت آنتی‌دیابتیک است و تشکیل فروکتوزآمین و محصولات پیشرفته حاصل از گلایکیشن را کاهش می‌دهد و همچنین فراگمانتاسیون آلبومین گلیکه را مهار می‌کند. دارچین دارای خواص آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌دیابتی بوده و می‌تواند از عوارض دیابت شیرین جلوگیری کند. بر اساس این خواص، می توانیم استفاده از این گیاه را در بیماران دیابتی پیشنهاد کنیم.

کلیدواژه‌ها: آنتی اکسیدان، دارچین، دیابت شیرین، گلایکیشن.

مقدمه

گیاهان دارویی همواره به‌دلیل توانایی تولید متابولیت‌های ثانویه (ترپنوییدها، پلی‌فنل‌ها، آلکالوییدها و غیره) از مهمترین منابع دارویی در پیشگیری و درمان بیماری ها بوده اند [۷]. آنتی‌اکسیدان‌های گیاهی مانند پلی‌فنل‌ها و فلاونوییدها از مهمترین عوامل محدود

کننده‌ی آسیب‌ها و استرس‌های اکسیداتیو در بدن محسوب می‌شوند که با مهار رادیکال‌های آزاد نقش مهمی را در پیشگیری و درمان بسیاری از بیماری‌ها ایفا می‌کنند که برخی به تغییر شیوه زندگی، افزایش سن و خصوصاً افزایش ارتباط با تشکیل گونه‌های اکسیژنی واکنش‌گر (Reactive Oxygen Species: ROS) مربوطتند. به‌همین دلیل استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در مواد غذایی و مخصوصا گیاهان دارویی به عنوان مواد طبیعی آنتی‌اکسیدان و ضد سرطان مورد توجه بیشتری قرار گرفته است [۱۳].

رادیکال‌های آزاد، به دلیل داشتن الکترون آزاد فعال، ناپایدارند. گونه‌های ROS شامل آنیون سوپراکسید، رادیکال هیدروکسیل و پراکسید هیدروژن می‌باشد و تمایل به واکنش با سایر مولکول‌ها را دارند و از این جهت می‌توانند به سلول‌ها و بافت‌ها آسیب برسانند [۲].

این مولکول‌ها در غلظت‌های بالا موجب ایجاد وضعیتی به نام «استرس اکسیداتیو» می‌گردند که به علت بر هم خوردن تعادل بین میزان رادیکال‌های آزاد از یک طرف و توان سیستم دفاع آنتی اکسیدانی از سوی دیگر ایجاد می‌گردد[۲]. بیماری‌هایی مانند دیابت، سرطان، آترواسکلروز، آرتریت، اختلالات قلبی عروقی، صدمات فیزیکی و پیری، ارتباط اساسی با استرس اکسیداتیو دارند[۲۲].

مواد غذایی، حاوی فلزات واسطه بوده و یا در طول زمان فرایند تولید به آن آلوده می‌شوند. عناصر واسطه‌ی دو ظرفیتی نقش مهمی را به عنوان کاتالیزور در فرایندهای اکسیداتیو ایفا نموده و منجر به تشکل رادیکال‌های هیدروکسیل و واکنش‌های تخریبی هیدروپراکساید می‌شوند. یکی از مکانیسم‌های فعالیت آنتی‌اکسیداتیو گیاهان، کلاته کردن فلزات انتقالی است. کلاته کننده‌ها با تشکیل کمپلکس با آهن و در واقع جلوگیری از واکنش آهنII با پراکسید هیدروژن، مانع تولید رادیکال هیدروکسیل می‌گردد[۱۲]. کاهش گروه‌های تیول نیز یکی از مارکرهای آسیب رادیکال-های آزاد می‌باشد[٦].

از آنجا که فروکتوز آمین از مهمترین عوامل ایجاد ضایعات عروقی می باشد، لذا کاهش آن یک روش درمانی برای به تأخیر انداختن ضایعات عروقی در افراد مبتلا به دیابت می‌باشد و توان جلوگیری از تولید فروکتوزآمین، می‌تواند به عنوان قدرت ضد دیابتی هر ترکیب محسوب گردد[۱۵].

تغییرات پروتئین‌ها توسط گلایکیشن غیر آنزیمی شامل یک سری از واکنش‌ها است که مجموعاً واکنش‌های مایلارد نامیده می‌شود و می تواند موجب آسیب‌های جدی به سلول یا بافت گردد. این تغییرات با بالا رفتن مزمن میزان قند خون اهمیت چشمگیری پیدا می‌کند[٤].

از آنجاییکه برخی گیاهان قادر به سنتز مواد موثر ثانوی و فعال، از جمله پلی فنل‌ها هستند و همچنین قدرت پاک کنندگی رادیکال‌های آزاد و کلاته کنندگی فلزات را دارند [۲۲]، در سال‌های اخیر به منظور پیشگیری و درمان بیماری‌های شایع انسان و دام مورد توجه قرار گرفته‌اند به همین دلیل است که انجام تحقیقات اتنوفارماکولوژیکی، فیتوشیمیایی، آنتی‌اکسیدانی و آنتی دیابتیک بر روی طعم دهنده های غذائی، سبزیجات و گیاهان در رژیم غذائی بسیار مورد توجه محققین قرار گرفته است[۱۳].

دارچین با نام علمی *Cinnamomum verum* که تحت عنوان دارچین واقعی True cinnamon شناخته می‌شود، درختی از راسته‌ی لورالس (Laurales)، خانواده‌ی برگ‌بوها (Lauraceae) و از جنس

دارچین‌ها (Cinnamomum) می‌باشد. دارچین بومی سیلان و هندوستان می‌باشد[۱].

قسمت اعظم اسانس دارچین را آلدئید سینامیک (Aldehyde Cinnamique) یا سینامالدئید (Cinnamaldehyde) (٦٥ تا ٧٥ درصد) تشکیل می‌دهد. بعلاوه دارای ٤ درصد از فنل‌ها، به ویژه اوژینول همراه با فلاندرن، سافرول (به مقدار کم)، فورفورول و غیره است. ترکیبات شیمیایی فعال این گیاه سینامالدئید و اوژینول Eugenol می‌باشند[۱۱]. دارچین، مدت‌های مدیدی است که به عنوان ادویه و دارو به‌کار رفته اما اطلاعات زیادی در خصوص مکانیسم دقیق فارماکولوژیک آن در دست نیست. دارچین به صورت سنتی در مواردی همچون مسکن و تب بُر در سرماخوردگی، سردرد، درد عضلانی، درد مفاصل و اختلال قاعدگی مصرف می‌شود. مطالعات زیادی روی دارچین صورت گرفته که نشان می‌دهد که این گیاه فعالیت‌های فارماکولوژیکی نظیر آنتی‌اکسیدان، ضد هیپرکلسترولمی، ضد میکروبی، ضد قارچی، ضد دیابت، تب بُر و مسکن و همچنین خاصیت ضد التهاب دارد [١٦،١١و١٩].

با توجه با استفاده‌های فزاینده این گیاه در تجربیات طب سنتی اغلب کشورها از جمله ایران، در این پژوهش خواص فیتوشیمیایی، فعالیت آنتی اکسیدانی و خاصیت آنتی‌گلایکیشن عصاره‌ی آبی پوست دارچین مورد مطالعه قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

۱- روش تهیه‌ی عصاره

در این تحقیق پوست گیاه دارچین تهیه شد و پس از تایید اصالت توسط کارشناس هرباریوم، ابتدا شسته شد و به منظور انجام عملیات عصاره‌گیری، پودر و عصاره آبی آن با استفاده از روش خیساندن برای انجام مطالعات فیتوشیمیایی استخراج گردید. بدین صورت که پس از پودر کردن توسط هاون، ۵۰ گرم از آن با ۳۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر در دمای ٤٠ درجه سانتی‌گراد مخلوط شد و سپس به مدت ٤٨ ساعت در حرارت اتاق بر روی شیکر shaker قرار داده شد. عصاره‌ی حاصل از کاغذ صافی عبور داده شد. محلول به دست آمده در انکوباتور ٤٠ درجه تحت شرایط سترون خشک شد.

۲- روش اندازه‌گیری اثر ضدرادیکالی به روش DPPH

بررسی اثر آنتی رادیکالی عصاره با استفاده از رادیکال پایدار DPPH (Diphenyl-1-picryl hydrazyl) مطابق با روش اولیوریا و همکاران با اندکی اصلاح انجام شد[۱۰]. دی فنیل پیکریل هیدرازیل نوعی رادیکال آزاد پایدار است. ظرفیت عصاره در دادن هیدروژن برای پاک کردن DPPH، به عنوان میزان توانایی آنتی‌اکسیدان به کار می‌رود. ٤ 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 ۰/۵ ساعت در اتاق تاریک انکوبه گشت. سپس جذب محلول توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در ۵۱۷ نانومتر قرائت شد. از آنتی اکسیدان‌های BHT و اسید آسکوربیک به عنوان استاندارد استفاده شد. اثر آنتی رادیکالی با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید.

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

A_c: جذب کنترل؛ As: جذب محلول حاوی عصاره یا استاندارد می باشد.

۳- روش سنجش فعالیت کلاته کنندگی آهن II

در اندازه‌گیری قدرت کلاته کنندگی آهن به روش دنیز، به عصاره، محلول ۲ میلی‌مولار کلرید آهن II و محلول ۵ میلی‌مولار فروزین اضافه شد و پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در دمای محیط، جذب مخلوط در طول موج ۵۶۲ نانومتر قرائت شد. درصد مهار تشکیل کمپلکس آهن-فروزین یا قدرت شلاته کنندگی هر غلظت از عصاره با فرمول زیر معین شد. از EDTA به عنوان استاندارد استفاده گردید. گروه کنترل، محلول آهن-فروزین بود.

$$\text{Chelating activity\%} = 100\ (A_{control} - A_{sample})/A_{control}$$

A_c جذب کنترل؛ As جذب محلول حاوی عصاره یا استاندارد بود[۱۲].

٤- روش سنجش میزان گروه‌های تیول

برای اندازه گیری مقدار گروه‌های تیول، از روش رنگ‌سنجی DTNB (۲،۲ دی تیو نیتروبنزوئیک اسید) استفاده شد. DNTB با این گروه‌ها کمپلکس زرد رنگ ایجاد نموده که در طول موج ٤۱۲ نانومتر حداکثر جذب را داراست.

به‌منظور انجام این آزمایش در روش المان Ellmans، ۱۰ میکرولیتر از عصاره (حاوی ۱ میلی‌گرم) را با ۹۰ میکرولیتر از DTNB ۵ میلی مولار، ۱۰۰ میلی‌لیتر PBS، در pH=۷/٤ و در حرارت اتاق به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه نمودیم. سپس جذب محلول حاوی عصاره در ٤۱۲ نانومتر قرائت شد. سطح گروه‌های تیول توسط منحنی استاندارد L- سیستئین (۰/۵۰ تا ۰/۰۱۵ میلی‌مولار) بر اساس میلی‌مول سیستئین در میلی‌گرم عصاره، محاسبه گردید [۹ و۱۰].

۵- روش سنجش ظرفیت تام آنتی اکسیدان TAC

بدین منظور از روش دستی FRAP با اندکی تغییر، استفاده شد. به‌طور خلاصه، ۱۰ میلی‌لیتر از محلول بافر ۰/۳ مولار از استات سدیم(pH=۳/٦)، ۱ میلی‌لیتر ۲و٤و٦- تری پیریدیل S تری آزین(TPTZ) ۱۰ میلی مولار در HCl ٤۰ میلی‌مولار و ۱ میلی لیتر از $FeCl_3$ ۲۰ میلی‌مولار مخلوط گردیدند و ۱۰ دقیقه در بن‌ماری ۳۷ درجه نگهداری شد. سپس ۱۰ میکرولیتر (۱ میلی-گرم) از عصاره را به ۱/۵ میلی‌لیتر از واکنشگر FRAP افزودیم. ظرفیت آنتی اکسیدان عصاره، مطابق با منحنی حاصل از جذب نوری محلول سریال رقت استاندارد سولفات آهن در ۵۹۳ نانومتر، معادل «میلی‌مول سولفات آهن » محاسبه شد[٦ و ۹].

٦- روش سنجش مقدار تام فنل

مقادیر فنل تام عصاره به روش رنگ سنجی فولین و سیو-کالتیو Folin–Ciocalteu با اندکی تغییر اندازه‌گیری شد[٦]. بدین منظور ۱۰ میلی‌گرم از پودر عصاره را در ۱ میلی لیتر آب حل نمودیم. سپس ۱۰۰ میکرولیتر (حاوی ۱ میلی‌گرم) از آن را به ۲/۸ میلی‌لیتر آب و ۲ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۲٪ و ۰/۱ میلی لیتر فولین ۵۰٪ به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق گذاشته شد و جذب آن را در ۷۵۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر قرائت شد. محتوای فنل تام در این روش، به صورت «معادل میلی‌گرم اسید گالیک در گرم عصاره»، طبق معادله‌ی خطی منحنی استاندارد محاسبه شد.

بر اساس ساخت سریال رقت از اسید گالیک در رقت‌های ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ٦/۲٦ و ۳/۱۲ میلی‌گرم در لیتر و قرائت جذب آن در اسپکتروفوتومتر، منحنی

اسناندارد مربوطه را رسم نمودیم. با جذب قرائت شده از محلول حاوی عصاره، مقدار فنل آن تعیین گردید.

۷- روش سنجش مقدار فلاوونوئید

میزان فلاونوئیدها با توجه به روشBahorun و همکاران تعیین شد. محتوای فلاونوئید تام با انتقال بر منحنی استاندارد کوئِرسِتین به عنوان «معادل میلی‌گرم کوئرستین (Quercetin Equivalent, QE) در گرم- عصاره»، بیان می‌شود[۱٤].

بدین منظور ۱۰ میلی‌گرم از پودر عصاره را در ۵ میلی‌لیتر آب حل کرده و ۰/۵ میلی‌لیتر (۱ میلی‌گرم) از آن را برداشته و با اضافه کردن آن به ۱/۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۵٪ و ۱۰۰ میکرولیتر از $AlCl_3$ ده درصد و ۱۰۰ میکرولیتر استات پتاسیم ۱ مولار و ۲/۸ میلی لیتر آب، ٤۰ دقیقه در حرارت ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه کرده و سپس جذب آن را در ٤۱۵ نانومتر در دستگاه اسپکتروفوتومتر قرائت نمودیم. نتیجه بر اساس منحنی استاندارد کوئرستین محاسبه گردید. منحنی استاندارد با قرائت جذب غلظت‌های‌سریالی کوئرستین ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ٦/۲۵، ۳/۱۲ و ۱/۵٦ میلی‌گرم در لیتر، حاصل می‌شود.

۸- روش سنجش میزان مهار فروکتوزآمین

فروکتوزآمین یک محصول آمادوری حاصل از مجاورت قند و پروتئین است و نقش مهمی در ایجاد ضایعات عروقی دارد. لذا کاهش فروکتوزآمین یک روش درمانی برای به تأخیر انداختن ضایعات عروق در افراد مبتلا به دیابت می‌باشد[۵].

بر اساس مطالعات قبلی، میزان مهار تشکیل آلبومین گلیکه (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. بطور خلاصه ۱۰ میکرولیتر از محلول‌های گلیکه‌ی آلبومین، به صورت 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 میلی- مولار NBT (در بافر کربنات ۰/۱ مولار با pH=۱۰/٤) 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 گلیکه بدون حضور و در حضور عصاره‌ها و آمینوگوانیدین(۲ میلی‌گرم در میلی لیتر) به عنوان یک مهارکننده‌ی استاندارد، میزان مهارکنندگی مشخص شد [۱۵].

۹- روش سنجش محصولات نهایی گلایکیشن پیشرفته

نمونه‌های آلبومین گلیکه تهیه شده در مرحله‌ی قبل (در حضور و عدم حضور عصاره در غلظت‌های ذکر شده و همچنین حضور آمینوگوانیدین) جهت سنجش میزان محصولا نهائی پیشرفته گلایکیشن با روش اسپکتروفلورومتری مورد استفاده قرار گرفت[۵].

این آزمایش با استفاده از دستگاه فلورومتر Jasco FP-6200 و در طول موج‌های ۳٤۰ نانومتر و ٤٤۰ نانومتر به ترتیب برای تحریک و نشر انجام گردید.

۱۰- روش سنجش میزان مهار فراگمانتاسیون آلبومین

ابتدا آلبومین را با فروکتوز (۲۰۰ میلی مولار) و در حضور یون مس (۱۰۰ میکرومولار) مخلوط نموده و پس از تیمار یک هفته‌ای در حضور آمینوگوانیدین 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 رنگ‌آمیزی 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 محاسبه‌ی میانگین و انحراف معیار ارائه شده‌اند. برای تعیین اختلاف یا عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها از آزمون ANOVA و تست Dunnett توسط نرم افزار SPSS version 11 استفاده شد. $P<0.05$ به‌عنوان سطح معنی‌دار نتایج در نظر گرفته شد.

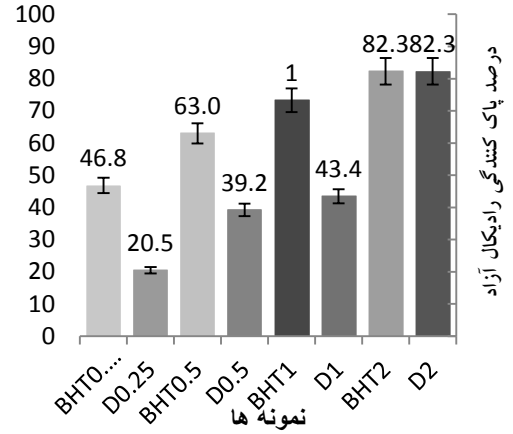
یافته‌های پژوهش:

۱۱- نتایج آزمایش سنجش مهار DPPH

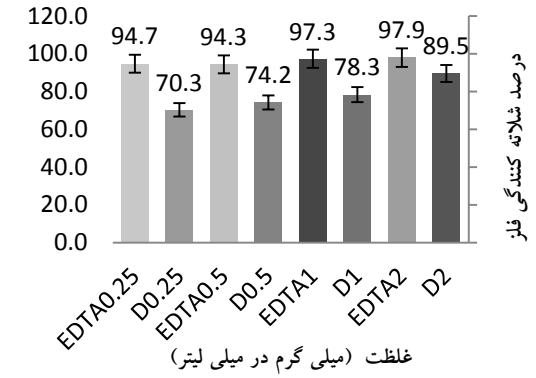
در نمودار ۱ میزان قدرت پاک کنندگی کنندگی رادیکال پایدار DPPH، توسط BHT، و غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره نشان داده شده است. عصاره‌ی دارچین در غلظت‌های فوق الذکر به‌ترتیب ۲۰/۴۹±۰/۸۹، ۳۹/۲۲±۰/۲۸، ۴۳/۴۵±۰/۸۶ و ۸۲/۲۷±۰/۵۱ درصد قدرت پاک کنندگی DPPH را نشان داد.

۱۲- نتایج سنجش فعالیت شلاته کنندگی آهن II

چنانچه در نمودار ۲ مشاهده می‌شود، درصد شلاته کنندگی فلز، با افزایش غلظت دارچین افزایش می‌یابد و خصوصا در دوز بالاتر، این افزایش چشمگیرتر است و با EDTA اختلاف کمتری دارد.



نمودار۱: مقایسه قدرت پاک کنندگی رادیکال غلظت‌های مختلف دارچین و BHT



نمودار۲: مقایسه درصد شلاته کنندگی غلظت‌های مختلف دارچین با EDTA

۱۳- نتایج روش سنجش میزان گروه‌های تیول

بر اساس روش مذکور، جذب نوری حاصل از اسپکتروفوتومتری غلظت‌های مختلف سیستئین به عنوان استاندارد، به ترتیب ۰/۰۵۴، ۰/۰۳۸، ۰/۰۲۰، ۰/۰۱۴، ۰/۰۰۹ و ۰/۰۰۷ به دست آمد.

بر اساس تطبیق مقادیر جذب نمونه با نمودار ترسیمی استاندارد با نرم‌افزار curve exp، میزان تیول دارچین، ۰/۰۷± ۰/۱۴۴ «معادل میلی مول سیستئین در هر گرم از عصاره» می‌باشد.

۱۴- میزان ظرفیت تام آنتی اکسیدان دارچین

مطابق با روش مذکور، ظرفیت آنتی‌اکسیدان هر غلظت از عصاره‌ی دارچین ا بر اساس «میلی‌مول سولفات آهن در میلی‌گرم عصاره» محاسبه شد که نتایج حاصل جدول۱ مشاهده می‌شود. طبق نتایج، با افزایش غلظت عصاره، ظرفیت تام آنتی‌اکسیدان افزایش می‌یابد.

جدول۱: ظرفیت آنتی اکسیدان غلظت‌های مختلف عصاره‌ی دارچین

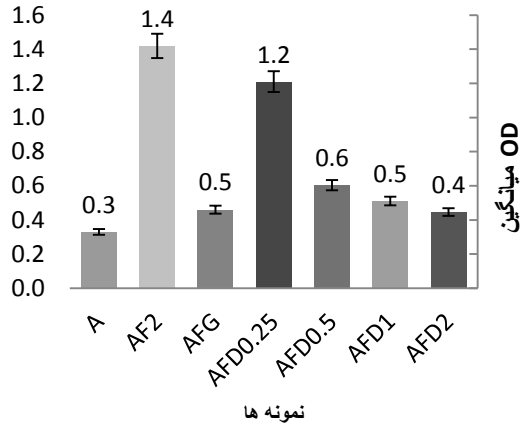
نمونه	ظرفیت آنتی اکسیدانی:میانگین ± انحراف معیارمیانگین $FeSO_4,7H_2O$ mM/mg
دارچین ۰/۲۵	۰/۲۵۸±۰/۰٤
دارچین ۰/۵	۰/٤٦۳± ۰/۰۵
دارچین ۱	۰/۵۳± ۰/۰۲
دارچین ۲	۰/۷۰٦±۰/۰۷

۱۵- میزان فنل و فلاوونوئید عصاره ی دارچین

به‌منظور اندازه‌گیری میزان فنل و فلاوونوئید عصاره‌ی دارچین، مطابق روش کار، منحنی‌های استاندارد بر اساس به ترتیب اسیدگالیک و کوئرستین رسم شد و با انطباق جذب‌های حاصل از اسپکتروفوتومتری غلظت‌های مختلف عصاره‌ی دارچین، مقدار فنل آن، ۱/۸۳± ۳۱/۳٤ میلی‌گرم اسید گالیک در هر گرم از عصاره و مقدار فلاوونوئید آن، ۱/۳۷ ±۱۹/۸۹ میلی‌گرم کوئرستین در هر گرم از عصاره به دست آمد.

۱۶- میزان مهار فرو کتوزآمین

با استفاده از تست Dunnett مشاهده می‌شود میزان جذب آلبومین گلیکه با فروکتوز ۲۰۰ میلی‌مولار در مقایسه با آلبومین غیرگلیکه، افزایش معنی‌داری (p< ۰/۰۰۱) داشته است (افزایش ۸٤/۸ درصدی). آمینوگوانیدین سبب کاهش ٦۷/۹٦ درصدی در میزان فروکتوزآمین شده است (p<۰/۰۰۱). دوزهای ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از عصاره دارچین به ترتیب مهار ۱٦/٤، ۵۷/۹، ٦٤/۲ و ٦۸/۸ درصدی اعمال کردند (نمودار ۳).



نمودار۳: مقایسه‌ی جذب‌های نوری محلول‌های حاصل از تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره دارچین بر محلول آلبومین و فروکتوز. آمینوگوانیدین به عنوان استاندارد در نظر گرفته شده است.
A : آلبومین /AF2 : محلول آلبومین-فروکتوز ۲۰۰ میلی مولار/ AFG: آلبومین، فروکتوز و آمینوگوانیدین/. D: دارچین.

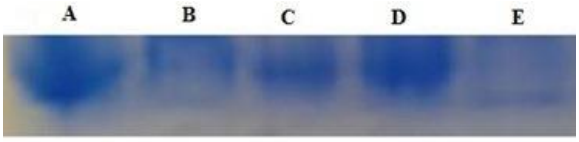
۱۷- میزان ممانعت از محصولات نهایی حاصل گلیکیشن پیشرفته AGEs

دوزهای ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از عصاره‌ی دارچین، توانست AGEs را به ترتیب ۹ ، ۵۲/۸ و ۷۵/۲ درصد مهار کند (p<۰/۰۰۱). آمینوگوانیدین به عنوان یک مهارکننده‌ی استاندارد در این شرایط، مهار ۷۳/۰۸ درصدی نشان داد.

۱۸- تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره‌ها بر فراگمنتاسیون ناشی از آلبومین گلیکه

چنانچه مشاهده می‌شود، باند متراکم ناشی از آلبومین با اضافه شدن فروکتوز ، فراگمانته شده است.

با استفاده از آمینوگوانیدین، این فراگمانتاسیون کاهش یافته و در واقع این ترکیب تا حد زیادی مانع از فراگمانتاسیون شده است. دارچین در غلظت بالاتر به خوبی توانایی ممانعت از فراگمانتاسیون را دارد.



شکل۱ :نمای الکتروفورز SDS-PAGE حاصل از تأثیر آمینوگوانیدین و غلظت‌های مختلف دارچین بر فراگمانتاسیون آلبومین-فروکتوز. A: آلبومین، B: آلبومین-فروکتوز، C: آلبومین-فروکتوز + آمینوگوانیدین۲mg/ml، D و E : آلبومین – فروکتوز + غلظت‌های ۲ و ۱۰ mg/mL از دارچین.

بحث و نتیجه‌گیری:

براساس این پژوهش، قدرت پاک کنندگی رادیکال DPPH عصاره‌ی آبی دارچین به طور وابسته به دوز افزایش می‌یابد و درصد آن در دوز ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر(۸۲/۲۷%) نیز به BHT (۸۲/۲۸%) نزدیک است.

افزایش قدرت کلاته کنندگی یون فرو، با افزایش غلظت عصاره‌ی دارچین (با استاندارد EDTA) افزایش یافت. این نتیجه با نتیجه‌ی حاصل از پژوهش [۲۱]. همخوانی دارد. مطالعه‌ی اخیر بر روی عصاره‌ی متانولی دارچین صورت گرفته بود.

در مطالعه‌ی حاضر، میزان گروه‌های تیول عصاره‌ی دارچین ۰/۰۷ ± ۰/۱٤٤ معادل «میلی‌مول سیستئین در هر گرم از عصاره» بود که شاخص آنتی‌اکسیدان نمونه‌ها محسوب می‌شود. در مطالعه‌ی Roussel و همکاران، اضافه کردن دارچین به رژیم غذایی نمونه‌ی انسانی با نقص گلوکز ناشتا که دچار چاقی هستند، موجب افزایش میزان گروه‌های تیول و افزایش قدرت احیاکنندگی یون فریک (FRAP) در پلاسما شد و لذا ظرفیت آنتی اکسیدان پلاسما افزایش یافت [۲۰].

در اندازه‌گیری خصلت آنتی اکسیدانی عصاره‌ی آبی دارچین به روش FRAP، افزایش خصلت آنتی‌اکسیدانی وابسته به دوز مشاهده شد. این نتیجه، با نتیجه‌ی حاصل از مطالعه‌ی Jang و همکارانش که به روش HPLC انجام گرفته بود مشابه است [۸].

در سنجش درصد مهار فروکتوزآمین، میزان جذب نوری محلول آلبومین گلیکه شده با فروکتوز ۲۰۰ میلی‌مولار در مقایسه با آلبومین غیرگلیکه، افزایش معنی‌داری داشت (افزایش ۸٤/۸ درصدی). آمینوگوانیدین به عنوان یک مهارکننده استاندارد، سبب کاهش ٦۷/۹٦ درصدی در میزان فروکتوزآمین شده است،. استفاده از دوز ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتری از عصاره‌ی دارچین، موجب کاهش ٦۸/۸ درصدی در جذب نوری محلول آلبومین گلیکه با فروکتوز ۲۰۰ میلی مولار شد. در مطالعه‌یPreuss و همکارانش عصاره‌ی آبی دارچین توانست میزان فروکتوزآمین در گردش خون را کاهش دهد که در واقع به نحوی مشابه با نتایج حاصله از مطالعه‌ی حاضر می‌باشد [۱۸].

بر اساس نتایج حاصله، عصاره‌ی دارچین در غلظت‌های ۱ و ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، تشکیل این محصولات را به ترتیب ۵۹ و ۷۰/۵ درصد (در مقایسه با آمینوگوانیدین به عنوان مهارکننده‌ی استاندارد) کاهش داد. لذا در این غلظت‌ها دارای آثار آنتی دیابتی می‌باشد. در مطالعه‌ای کهPeng و همکارانش انجام دادند، مشخص شد که آثار آنتی گلایکیشن دارچین به به‌دام انداختن گروه‌های واکنشگر کربونیل نیز مربوط است[۱۷].

در بررسی اثر مهاری عصاره‌های آبی دارچین بر فراگمانتاسیون پروتئین، چنانچه در الگوی الکتروفورزی مشخص است، عصاره‌دارچین مانع فراگمانتاسیون آلبومین متعاقب تشکیل فروکتوزآمین شد. به عبارت دیگر مانع صدمات ناشی از این پدیده بر پروتئین‌ها شد و لذا قادر است از عوارض دیابت جلوگیری‌کند که این اثر در غلظت‌های بالاتر است و با نتایج پژوهش‌های [۲۳]. منطبق است. در این مطالعه، غلظت‌های مختلف قندهای مختلف در شرایط آزمایشگاهی متفاوت مورد مطالعه قرار گرفت 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 گلیکه شدن پروتئین‌ها تأکید دارد.

بر اساس مطالعه‌ی حاضر دارچین دارای آثار آنتی اکسیدانی، آنتی رادیکالی و آنتی دیابتیک می‌باشد و می‌تواند با جلوگیری از تغییر ساختار پروتئین‌ها بدنبال گلایکیشن، مانع تولید ترکیباتی گردد که به علت تغییر ساختمان پروتئین‌های مربوطه، موجب عوارض دیابت می‌شوند.

سپاسگزاری: از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد همدان تشکر بعمل می آید.

منابع:

[1] Abeysekera WPKM, Premakumara GAS, and RatnasooriyaIn WD, 2013. InVitro Antioxidant Properties of Leaf and Bark Extracts of Ceylon Cinnamon *(Cinnamomum zeylanicum Blume)*. Tropical Agricultural Research, 24 (2), PP: 128 – 138

[2] Arner E, Nordberg, 2001. Reactive Oxygen Species, Antioxidants, and the Mammalian Thioredoxin System. Free Radical Biology and Medicine J, 31(11), PP: 1287-1312.

[3] Asadi S, Sohrabi M, Zarei S, Ghyasvand T, Rezaei Farimani A, Goodarzi MT, 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), PP:78-82.

[4] Bhattacherjee A, Chakraborti A, 2013. Inhibitory Effect of *Piper Butle* Linn. Leaf Extract on Protein Glycation Quantification and Characterization of the Antiglycation Component. Indian Journal of Biochemistry and Biophysics, 50, PP:529-536

[5] Caengprasath N, Ngamukote S, Mäkynen K, & Adisakwattana S. 2013. The Protective Effect of Pomelo Extract*(Citrus Grandis L* Osbeck) Against Fructose Mediated Protein Oxidation and Glycation. EXCLI Journal. 12,PP: 491-502.

[6] Chaouche T, Haddouchi F, Ksouri R, Medini F, El-Haci I, Boucherit Z, et al. 2013. Antioxidant activity profiling by spectrophotometric methods of phenolic extract of *Prasium majus L*. Free Radicals and Antioxidants. 3, PP:43-46.

[7] Ghasemi K, Ghasemi Y, Ehteshamnia A, Nabavi F, Ebrahimzadeh A, Pourmand F. 2011. Influence of environmental factors on antioxidant activity, phenol and flavonoid content of walnut. Medicinal plant. Medicinal Plant, 23, PP: 1133-1138.

[8] Jang HD, Chang KS, Huang YS, Hsu CL, Lee SH, Su MS, 2007. Principal Phenolic Phytochemicals and Antioxidant Activities of Three Chinese Medicinal Plants. Food Chemistry,103(3), PP:749–756.

[9] 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,PP: 171-175.

[10] Kaviarasan S, Naik G, Gangabhagirathi R, Anuradha C, Priyadarsini K. 2007. In vitro Studies on Antiradical and Antioxidant Activities of Fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) Seeds. Food Chemistry, 103, PP:31–37.

[11] Manosi D, Suvra M, Budhimanta M, Jayram H. 2013. Ethnobotany, Phytochemical and Pharmacological

Aspect of *Cinnamomum Zeylanicum Blume*. International Research Journal of Pharmacy, 4(4), PP: 58-63.

[12] Mathew S, Abraham T. 2006. Studies on the antioxidant activities of cinnamon (*Cinnamomum verum*) bark extracts, through various in vitro models. Food Chemistry, 94, PP: 520–528.

[13] Mazandarani M, Makri S, Bajian G. 2011. Evaluation of phytochemical and antioxidant activity in different parts of *Heracleum gorganicum* rech F. in Golestanprovince, North of Iran. Iranian Journal Plant Physiology. 2(2): 381-388.

[14] 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, PP: 571-577.

[15] Meeprom A, Sompong W, Chan C, 2013. Adisakwattana S. Isoferulic Acid, a New Anti-Glycation Agent, Inhibits Fructose and Glucose-Mediated Protein Glycationin Vitro. Molecules, 18, PP: 6439-6454.

[16] Pandey S, Pandey R, Singh R. 2014. Phytochemical Screening of Selected Medicinal Plant Cinnamon Zeylanicum bark extract, Area of research; Uttarakhand, India. International Journal of Scientific and Research Publications, 4(6), PP: 1-6.

[17] Peng X, Cheng KW, Ma J, Chen B, Ho CT, Lo C, et al. 2013. *Cinnamon* Bark Proanthocyanidins as Reactive Carbonyl Scavengers To Prevent the Formation of Advanced Glycation Endproducts. J. Agric. Food Chem, 6, PP: 1907–1911.

[18] Preuss H, Echard B, Polansky M, Anderson R. 2006. Whole *Cinnamon* and Aqueous Extracts Ameliorate Sucrose-Induced Blood Pressure Elevations in Spontaneously Hypertensive Rats. Journal of the American College of Nutrition, 25(2), PP: 144-150.

[19] Ranasinghe P, Pigera S, Premakumara G, Galappathy P, Constantine G, Katulanda P. 2013. Medicinal Properties of " True" Cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*): a systematic review. BMC Complementary & Alternative Medicine, 275(13), PP: 1-10.

[20] Roussel AN, Hininger I, Benaraba R, Ziegenfuss TN, Anderson RA. 2009. Antioxidant Effects of a Cinnamon Extract in People with Impaired Fasting Glucose That Are Overweight or Obese. Journal of the American College of Nutrition, 28(1), PP: 16-21

[21] Su L, Yin JJ, Charles D, Zhou K, Moore J, Yu, L. 2007. Total Phenolic Contents, Chelating Capacities, and Radical Scavenging Properties of Black Peppercorn, Nutmeg, Rosehip, Cinnamon and Oregano Leaf. Food Chemistry,100(3),PP: 990–997.

[22] 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), PP:96-102.

[23] Wijetunge D, Perera H, 2014. A Novel in Vitro Method to Identify Protein Glycation Inhibitors. Asian Journal of Medical Sciences, 5(3), PP:15-21.