Archive of SID

شناسایی ترکیبات موجود در موثرترین فراکسیون هیدرومتانولی حاصل از عصاره تام چای سیاه ایرانی بر پروفایل لیپیدی،استرس اکسیداتیوو عوامل التهابی در رتهای دیابتی نوع یک

بیت اله علیپور*[۱]، سرور علیپور[۲]، عباس دل آذر[۳]، علیر ضا استاد رحیمی[۴]، صدیقه بامداد[۵]

[۱]مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشکده بهداشت و تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران. [۲]معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران. [۳]دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز ، تبریز، ایران. [۴] دانشکده بهداشت و تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی تبریز ، تبریز، ایران. [۵] مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران.

تاریخ دریافت ۸۸/۱۰/۲۷ ، تاریخ پذیرش: ۸۹/۱/۲۴

Recognition of the most components in the most effective hydromethanol fraction of Iranian black tea on lipid profile, oxidative stress and inflammatory factors in type I Diabetic rats.

Alipoor B.[1], Alipoor S.[2], Delazar A.[3], Ostadrahimi A.[4], Bamdad Mogadam S.[5]

[1] School of Health & Nutrition, Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran. [2] Research Vice-Chancellor Offices, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran. [3]Faculty of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran. [4] School of Health and Nutrition, Tabriz University of Medical sciences, Tabriz, Iran. [5] Drugs Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

Received: 31 Jan. 2009, Accepted: 13 Apr. 2010

Objectives: Reliable findings indicate that lipid profile ,oxidative stress and inflammatory factors disorders has the main role in pathogeneses of diabetes and its complications. Traditionally plant extracts have been used for diabetes control. This study was aimed to recognition of the most components in the most effective hydromethanolic fraction of Iranian black orthodox tea on lipid profile, oxidative stress and inflammatory factors in type I Diabetic rats. **Methods:** This study was conducted on 35 rats which were randomly divided into 5 groups (7 rats in each group). The weight of rats was 200 – 250 gr. Total of groups was diabetic, and diabetes was induced by intraperitoneal injection of streptozotocin 60mg/kg. Groups 1 to 5 were received: carrier, methanol fractions of 20%, 40%, 60%, 80% plus 100% respectively. In the end of study biochemical factors was measured. Data were analyzed by using one ways ANOVA, SPSS statistic methods. Analytical, Preparative and NMR were used to recognize of components in the most effective fraction. **Results:** In this study concluded that the effective fraction on biochemical factors was 20% .The main component of 20% fraction were caffeine, epicatechingallat, quercetin and kaempferol. **Conclusion:** It can be concluded that injection of 20% fraction of black tea had positive effect on the prevention of incidence and develop of diabetes complications.

Keywords: *Diabetes, Rat, Black Tea, Hydromethanolic Fractions.*

زمینه و اهداف: شواهد فزاینده ای وجود دارد که اختلالات در پروفایل لیپیدی،استرس اکسیداتیوو عوامل التهابی نقش عمده ای را در پاتوژنز بیماری دیابت و توسعه عوارض آن بازی می کند و از قدیم الایام عصاره های گیاهی در کنترل این بیماری به طور تجربی مصرف می شد. لذا مطالعه حاضر با هدف شناسایی ترکیبات موجود در موثرترین فراکسیون هیدرومتانولی حاصل از عصاره تام چای سیاه ایرانی بر پروفایل لیپیدی،استرس اکسیداتیوو عوامل التهابی در رتهای دیابتی نوع یک صورت گرفت. **روش ها:** در این مطالعه ۳۵رت نر سه ماهه در محدوده وزنی ۲۵۰-۲۰۰ گرم انتخاب و توسط تزریق داخل صفاقی استرپتوزوتوسین(۶۰میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) دیابتیک و سپس بطور تصادفی به۵ گروه ۷تایی تقسیم و به مدت یکماه مورد مطالعه قرار گرفتند. به گروههای پنج گا نه رتهای دیابتیک به همراه رژیم پایه به ترتیب:۱- حامل و فراکسیون های متانولی + حامل:۲- ۲۰٪ ۳- ۴۰٪ ۴- ۶۰٪ و ۵- ترکیب ۸۰ و ۱۰۰٪ به صورت داخل صفاقی روزانه ترزیق شد. در پایان مطالعه از تمام گروهها خونگیری و پارامترهای مورد نظر با استفاده از کیتهای مربوطه اندازه گیری گردید. داده ها با استفاده از روش آنالیز واریانس یکطرفه و نرم افزار SPSS Ver.11.5 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. وبرای شناسایی ترکیبات موجود در موثرترین فراکسیون ازHPLC آنالیتیکال، تهیه ای وNMR استفاده شد. **یافته ها :** در این مطالعه مؤثرترین فراکسیون تأثیرگذار بر فاکتورهای مورد مطالعه فراکسیون ۲۰٪ شناسایی شد که ترکیبات عمده فراکسیون مذکور شامل: کافئین،اپی کاتشین گالات،کرستین وکامفرول می باشد. **نتیجه گیری:** تجویز فراکسیون۲۰٪ حاصل از چای سیاه بر عوامل موثر دربروز و توسعه عوارض بیماری دیابت تاثیر مثبت دارد.

واژه های کلیدی: *دیابت، رت، چای سیاه، فراکسیون هیدرومتانولی .*

* نویسنده مسئول :دکتر بیت الله علیپور، استادیار، علوم تغذیه، مرکز تحقیقات کاربردی دارویی،دانشکده بهداشت و تغذیه ، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تلفن: ۰۴۱۱-۳۳۵۷۵۸۰، نمابر: ۰۴۱۱-۳۳۴۰۶۳۴

**Corresponding Author:Beytollah Alipoor, Assistant Professor of Nutrition, School of Health & Nutrition, Drug Applied Research Center Department of Community Nutrition, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran. Tel: +98-411-3357580; Fax: +98-411-3340634; E-mail: balipoor@yahoo.com*

www.SID.ir

۱- مقد مه

دیابت ملیتوس شایعترین بیماری متابولیکی است که با افزایش قند حون ناشی از کمبود مطلق یا نسبی انسولین مشخص گردیده و در دراز مدت با عوارض چشمی، کلیوی، قلبی – عروقی و عصبی همراه می باشد (۳-۱).
تعداد افراد دیابتیک به دلایل افزایش جمعیت سالمندی، شهرنشینی، چاقی، عدم تحرک جسمانی روبه افزایش است. افـزایش شیوع دیابت، چـه در حـال و چـه در آینده بـرنامه ریزی صحیح جهت کنترل ایـن بیمـاری را می طلبد (۴،۵).
فلاوونوئیدها تر کیبات پلی فنلی با خواص درمانی هستند که در منابع گیاهی بالاخص چای یافت میشوند میزان فلاوونوئیدهای اپی کاتشین گالات، کرستین و کامفرول موجود در چای در مقایسه با سایر منابع گیاهی قابل ملاحظه است (۶). شواهد دقیقی وجود دارد که دریافت in vivo فلاوونوئیدهای چای سبز از بروز بیماریهای دژنراتیو جلوگیری می کند و دریافت طولانی مدت فلاوونوئیدهای چای سبز احتمالاً می تواند مانع چاقی زایی رژیم پرچرب شود و همچنین تاثیر مثبتی بـرعلیـه اختلالات متابولیسم گـلوکز و چربـی نـاشی از دیـــابت دارد که در نهایت مانع از بـروز عوارض بیماری دیـابت می شود (۷).
نتایج چند مطالعه نشان داده است که دریافت فلاوونوئیدهای چای نظیر کرستین می تواند بر روی کنترل فاکتورهای خطر دخیل در بروز بیماری دیابت موثر واقع شود لذا دریافت این مواد در کنترل عوارض این بیماری و یا پیشگیری از بروز آن تاثیرمثبت دارند (۱۵-۸) و از طرفی چای یکی از نوشیدنیهای عمده بعد از آب در میان مردم است و بیش از ۲/۳ مردم دنیا چای می نوشند (۱۶). ایران با جمعیتی حدود یک درصد از جمعیت کل جهان حدود ۴ تا ۴/۵ درصد از مصرف کل چای را به خود اختصاص داده و مصرف سرانه چای در ایران چهار بار بیشتر از مصرف سرانه جهانی است (۱۷). با وجود اینکه حدود ۸۰٪ چای مصرفی جها ن از نوع سیاه می با شد ولی تحقیقات بیشتر بر روی چای سبز متمرکز بوده و مضافا تر کیبات چای مناطق مختلف بر حسب واریته، فصل ، سن، آب وهوا وپـروسه فـرآوری متفـاوت می باشد بنا بـرا یـن تعیین اثـر چـای سیـــاه و فـراکسیون هـای حاصل از آن بر روی سلامتی ضروری است (۲۰-۱۸).
لذا با مد نظر قرار دادن اینکه تا کنون در راستای شناسایی فراکسیون موثر چای بر سلا متی بالاخص در افراد دیابتیک مطالعه ای انجام نیا فته است و همچنین مواد موجود در فراکسیون موثر آنالیز نشده است این مطالعه انجام گرفت.

۲- مواد و روش ها

۲-۱: مواد بکار رفته

حلالها ی بکار برده شده ساخت کارخانه مرک آلمان، استرپتوزوتوسین ساخت کارخانه زیگما ، Sep-Pack از نوع ODS و ساخت کارخانه Waters آمریکا، کیت های خارج: Randox انگلستان ،Caymanآمریکا ، Bendermed آلمان و کیت های داخل پارس آزمون

۲-۲: وسایل بکار رفته

ترازوی شیماتز با دقت ۰/۰۰۱ ژاپن، روتاری اواپوراتور ساخت کارخانه Heildolph آلمان، سا نتریفوز Beckman Avanti 300، دستگاه اتوآنالیزور Alcyon Aboott – فرانسه مدل 300، ترازوی دیجیتالی پند با د قت یک گرم، دستگاه الیزا Elesa Plate Readar ساخت کمپانی Awarness مدل Stat Fax 2100 آمریکا، دستگاه Analytical-HPLC شرکت CECIL انگلیس مدل Adept ، دستگاه HPLC preparative shimadzu مدل LC-8A ژاپن، دستگاه NMR ۲۰۰ مگاهرتز مدل Burker-Spectrospin

۲-۳: روش کار

۲-۳-۱: حیوانات مورد آزمایش

در ایـن مـطالعه تجـربی تـعداد ۳۵ رت نـر سـه ماهه ۲۵۰-۲۰۰ گرمی از مرکز پرورش حیوانات دانشگـاه علوم پزشکی تبریز تهیه و به محل مطالعه یعنی حیوانخانه مرکز تحقیقات کاربردی ـ داروئی منتقل شدند. رتها به منظور سازگاری با محیط بـه مدت دو هفته تحت رژیم پایه قرار گرفتند سپس رت هـا توسط تزریـق داخل صفاقی استرپتوزوتوسین (۶۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) دیابتیک شدند (۲۴-۲۱ ،۲) بعد از ۷۲ ساعت از تزریق استرپتوزوتوسین، قند خون ناشتا با استفاده از کیت پارس آزمون به صورت اتوماتیک توسط دستگاه اتوآنالیزور Alcyon Abbot ساخت کشور فرانسه اندازه گیری شد و رتهای با قند خون بالای ۲۵۰ میلی گرم در دسی لیتر به عنوان دیابتی نوع اول انتخاب و به طور تصادفی به ۵ گروه ۷ تایی تقسیم و به مدت یک ماه مـورد مـطا لعه قرار گرفتند (شرط قند خون بالای ۲۵۰mg/dl به عنـوان دیـــابتی نوع اول در پایان مطالعه نیز اعمال گردید) (۲۶، ۲۵، ۲۳-۲۱). در پایان مطالعه از رت ها خون گیری و پارامـــترهای مورد مطالعه با استفاده از دستورالعمل کیتهای اختصاصی و به توسط دستگاههای مربوطه به شرح زیر اندازه گیری شد سپس با معلوم شدن فراکسیون موثر بر پارامترهای فوق، آنالیز ترکیبات فراکسیون موثر در سه مرحله به شرح ذکر شده در قسمت ۴-۳-۲ صورت گرفت. کلسترول و تری گلیسرید بـا استفـاده از کیت پارس آزمون

www.SID.ir

داخل، آنتی اکسیدانت تام و آنزیمهای سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز با استفاده از کیت Randox انگلستان بصورت اتوماتیک توسط دستگاه اتوآنالیزور Alcyon Abbot ساخت کشور فرانسه ا ندازه گیری شد همچنین گلوتاتیون با استفاده از کیت Cayman آمریکا وعوامل التهابی (اینترلوکین ۱و۶ ،TNF_aوCRP) با استفاده از کیت Bendermed آلمان به روش ELISA با دستگاه Elesa Plate Readar ساخت کمپانی Awarness مدل Stat Fax 2100 آمریکا اندازه گیری شد.

۲-۳-۲: تهیه عصاره تام چای سیاه و فراکسیونهای آن

ابتداء ۳۰۰ گرم چای سیاه اورتودوکس تهیه شده از مرکز تحقیقات چای لاهیجان استان گیلان (کارخانه کاشف) توسط آسیاب مکانیکی کاملا پودر گردیده و سپس توسط حلال هیدرومتانلی ۷۰٪ به روش ماسراسیون در ۵ نوبت و به مدت ۵ روز عصاره گیری شد. عصاره پس از صاف نمودن، بوسیله دستگاه روتاری اواپوراتور تحت خلاء و در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد خشک گردید. ۲ گرم از عصاره خشک به Sep-pack منتقل گردیده و فراکسیونهای مختلف آن توسط ۲۰۰ میلی لیتر حلال ها با قطبیت فزاینده (مخلوط های آب و متانول به ترتیب با نسبتهای ۸۰-۲۰، ۶۰-۴۰، ۴۰-۶۰، ۲۰-۸۰ و ۰-۱۰۰) شستشو گردیدند. فرا کسیونهای حاصله نیز توسط دستگاه روتاری اواپوراتور تحت خلاء و در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد خشک گردیدند.

۳-۳-۲: نحوه تجویز فرا کسیونها به گروههای مختلف رتها

به گروههای پنج گا نه رتهای دیابتیک به همراه رژیم پایه به ترتیب: ۱- حامل و فراکسیون های متانولی + حامل: ۲- ۲۰٪ ۳- ۴۰٪ ۴- ۶۰٪ و ۵- ترکیب ۸۰ و ۱۰۰٪ (چون میزان فراکسیونهای بدست آمده از ۸۰٪ و۱۰۰٪ در حد کم بود لذا این دو با هم مخلوط و به یک گروه تجویز شد) با میزان تجویز بر حسب درصد بازد هی هر فراکسیون از عصاره تام به میزان ۵۰ میلی گرم در هر کیلوگرم وزن رتها بتوسط Sep-pack به صورت روزانه در حلال مناسب (دی متیل سولفوکساید به عنوان حا مل) حل و به میزان ۰/۳ میلی لیتر به هر رت به صورت داخل صفاقی روزانه توسط سرنگ انسولین ترزیق شد (۲۸-۲۶،۲۱) .

۴-۳-۲: آنالیز ترکیبات مژثرترین فراکسیون بر فاکتورهای مورد نظر

برای شناسایی ترکیبات فراکسیون مورد نظر مراحل زیر صورت گرفت. روش به کار گرفته شده، کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا (HPLC) بود.

۱-۴-۳-۲: مرحله Analytical-HPLC

در آغاز HPLC آنالیتیک انجام شد. هدف از انجام این مرحله، دست یابی به یک سیستم فاز متحرک مناسب جهت جداسازی ترکیبات موجود در فراکسیون بود. اولین سیستم بکار رفته، مخلوط آب و متانول بود که از ۱۰٪ متانول شروع و در زمان ۲۰ دقیقه به ۱۰۰ درصد می رسید. آنگاه پس از توقفی ۵ دقیقه ای در این وضعیت به ۱۰٪ باز می گشت پس از مشاهده الگوی کلی کروماتوگرام، در جهت بهبود وضعیت جداسازی مواد، نسبت به تغییر سیستم فاز متحرک، اقدام شد. پس از آزمایش سیستمهای ۱۰ تا ۷۰ و ۳۰ تا ۱۰۰ و ۱۰ تا ۶۰ نهایتا" آخرین مورد برگزیده شد. نمونه مورد تزریق فراکسیون ۲۰٪ با غلظت حدودا" ۵ میلی گرم بر میلی لیتر متانول ۲۰٪ تهیه شد و به میزان لازم در شرایط مختلف گرادیان به دستگاه HPLC آنالیتیک با ستون ODS تزریق گردید.

۲-۴-۳-۲: مرحله Preparative HPLC

در ادامه به کمک دستگاه HPLC تهیه ای در سیستم فاز متحرک (۶۰-۱۰٪) متانول در آب، کار جداسازی مواد انجام شد پیش از شروع این مرحله، ۰/۸ گرم از فراکسیون مورد نظر را در ۱۰ میلی لیتر متانول ۲۰ درصد حل کرده و سپس ۵ تزریق پیاپی ۰/۸ میلی لیتری صورت گرفت و مواد تشکیل دهنده فراکسیون بر اساس الگوی طیفی کروماتوگرام و زمانهای بازداری از یکدیگر جدا شدند هریک از مواد که پیک جداگانه ای در کروماتوگرام ایجاد می نمودند در ارلن مجزایی جمع آوری گردیده و به دنبال این مرحله، محلولهای بدست آمده به کمک دستگاه تبخیر در خلاء (Rotary evaporator) تغلیظ و نهایتا" خشک شدند و وزن آنها یادداشت گردید.

۳-۴-۳-۲: مرحله شناسایی ترکیبات به وسیله NMR

جهت شناسایی و تعیین ساختمان مواد خالص شده به وسیله دستگاه HPLC تهیه ای از روشهای طیف سنجی HNMR و CNMR استفاده گردید برای طیف گیری (Nuclear Magnetic Resonance) NMR ، نمونه ها در حلال متانول دو تره حل و به کار گرفته شد.

۵-۳-۲: آنالیز آماری

www.SID.ir

روش آماری مورد استفاده آنالیز واریانس یک طرفه بوده و آنالیزها با استفاده از برنامه آماری Ver.11.5 SPSS به صورت جداولی ارائه شد.

۳- نتایج

۳-۱: نتایج مربوط به پارامترهای بیوشیمیایی مورد مطالعه

در این مطالعه فراکسیون ۲۰٪ باعث کاهش معنی دار تری گلیسیرید (P=۰/۰۰۴)، کلسترول تام ،LDL کلسترول ، مالون دی آلدئید، اینترلوکین ۱ بتا ، اینترلوکین۶ TNF_a و CRP (P=۰/۰۰۱) و باعث افزایش معنی دار آنتی اکسیدانت تام (P =۰ /۰۰۹) ، سوپراکسید دیسموتاز(P=۰/۰۰۲)، گلوتاتیون پراکسیدازوگلوتاتیون (p=۰/۰۰۱ نسبت به سایر فراکسیونها در سرم رتهای دیابتیک شد (جدول ۱).

۳-۲: یافته های مربوط به شناسایی ترکیبات موجود در مؤثرترین فراکسیون تأثیرگذار بر پارامترهای مورد مطالعه

طبق نتایج آزمایشات بیوشیمیایی انجام گرفته، مؤثرترین فراکسیون بر فاکتورهای مورد مطالعه، فراکسیون ۲۰٪ شناسایی شد (جدول ۱) لذا نسبت به آنالیز ترکیبات این فراکسیون اقدام گردید نتایج حاصل از الگوی طیفی کروماتوگرام فراکسیون ۲۰٪ و همچنین زمانهای بازداری (Retention Time) در جداسازی به وسیله HPLC آنالیتیکال و HPLC تهیه ای پس از ۵ بار تزریق و طیف سنجی HNMR و CNMR منجربه شناسایی چهار ماده عمده در فراکسیون مذکور گردید.

۳-۲-۱: جداسازی به وسیله HPLC آنالیتیکال:

برای فراکسیون مذکور در HPLC آنالیتیکال از سیستم های آب ـ متانول استفاده استفاده گردید و برنامه گرادیانتی حلال های بکار برده شده عبارت از : متانول ۱۰٪ در زمان صفر دقیقه، متانول ۶۰٪ در زمان ۲۰ دقیقه، متانول ۶۰٪ در زمان ۲۵، متانول ۱۰٪ در زمان ۲۷ و متانول ۱۰٪ در زمان ۳۰ دقیقه بود.

۳-۲-۲: جداسازی به وسیله Preparative HPLC

مطابق نتایج حاصل از HPLC آنالیتیکال از مخلوطی از متانول در آب در سیستم پره پاراتیو استفاده گردید. برنامه گرادیانتی حلال عبارت از: متانول ۱۰٪ در زمان صفر دقیقه، متانول ۶۰٪ در زمان ۵۰ دقیقه، متانول ۶۰٪ در زمان ۶۲، متانول ۱۰٪ در زمان ۶۵ و متانول ۱۰٪ در زمان ۷۵ دقیقه بود. در ادامه به کمک دستگاه HPLC تهیه ای در سیستم فاز متحرک (۶۰-۱۰٪) متانول در آب، کار جداسازی محلول ترکیبات خالص با توجه به شکل پیکهای ظاهر شده در کروماتوگرام و زمان بازداری با ۵ تزریق پیاپی انجام شد. پس از جداسازی، محلولهای حاصل توسط دستگاه روتاری اواپراتور در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد کاملا" خشک و سپس باقیمانده آنها وزن گردید. بدین ترتیب ۴ ترکیب خالص ۱(زمان بازداری: ۲۱ دقیقه و وزن: ۲۹/۱ میلی گرم) ، ۲ (زمان بازداری: ۲۷ دقیقه و وزن۴/۳میلی گرم)، ۳ (زمان بازداری: ۳۴ دقیقه و وزن: ۸/۱ میلی گرم) و ۴ (زمان بازداری: ۳۸ دقیقه و وزن: ۱/ ۸ میلی گرم) حاصل گردید.

۳-۲-۳: نتایج حاصل از آنالیز ترکیبات به وسیله NMR

۳-۲-۳-۱: داده های طیف ترکیب شماره یک که در حلال متانول دوتره ثبت گردیده در جدول ۲ نشان داده شده است. پیک های مشاهده شده در NMR پروتون و کربن این ترکیب نشان میدهد که ساختار شیمیایی این ترکیب آروماتیک و با ۳ گروه متیل متصل به اتم های الکترونگاتیو میباشد.

۳-۲-۳-۲: داده های طیف ترکیب شماره ۲ که در حلال متانول دوتره ثبت گردیده در جدول ۳ نشان داده شده است. پیک های مشاهده شده در نواحی آروماتیک و همچنین در نواحی ppm۵/۳-۲/۹ طیف NMR پروتون و همچنین پیک های مشاهده شده در NMR کربن (ppm ۱۷۰-۹۸ و ۲۵/۹) دلالت بر حضور ساختار فلاوونوئیدی با حلقهC احیاء شده دارد.

۳-۲-۳-۳: داده های طیف ترکیب شماره ۳ که در حلال متانول دوتره ثبت گردیده در جدول ۳ نشان داده شده است. از الگوی پیک های مشاهده شده در NMR پروتون که حضور پیک های در نواحی آروماتیک ppm ۸-۶ و نیز پیک های در نواحی ppm ۴-۳ را بنمایش میگذارد اینطور میتوان نتیجه گرفت که ساختار شیمیایی این ترکیب یک فلاوونوئید گلیکوزیله میباشد.

۳-۲-۳-۴: داده های طیف ترکیب شماره ۴ که در حلال متانول دوتره ثبت گردیده در جدول۳ نشان داده شده است. همانند ترکیب شماره ۳ این ترکیب نیز با توجه به الگوی پیک های مشاهده شده در NMR پروتون دارای ساختار گلیکوزید فلاوونوئیدی میباشد.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱. اثر تجویز فراکسیونهای مختلف چای سیاه بر پارامترهای بیوشیمیایی رتهای دیابتیک

پارامتر	گروه				
	گروه۱ کنترل (حامل)	گروه ۲ (حامل + فراکسیون ۲۰٪)	گروه ۳ (حامل + فراکسیون ۴۰٪)	گروه ۴ (حامل + فراکسیون ۶۰٪)	گروه ۵ (حامل + ترکیب فراکسیون ۸۰٪ و ۱۰۰٪)
کلسترول (میلی گرم در دسی لیتر)	۹۰/۱۴±۳/۱۷	a۶۷±۳/۵۲ ↓	۹۱/۵۷±۲/۲۷	۸۷/۴۳±۳/۱۴	۹۶/۱۴±۱/۸۶
تری گلیسرید (میلی گرم در دسی لیتر)	۸۱±۵/۶۳	b۶۸±۷/۱۷ ↓	۹۴/۲۹±۶/۶۳	۹۶/۴۳±۹/۲۵	۱۰۸/۷۱±۵/۹۲
LDL کلسترول(میلی گرم دردسی لیتر)	۵۳/۰۹±۳/۰۱	a۳۰/۶۳±۲/۳ ↓	۵۳/۸۶±۲/۲۸	۴۸/۴۳±۳/۰۶	۵۶/۴±۱/۸۲
آنتی اکسیدانت تام (میلی مول در لیتر)	۰/۳۸±۰/۰۴۷	c۰/۵۷±۰/۰۰۲۸ ↑	۰/۴±۰/۰۰۴	۰/۳۶±۰/۰۰۵۲	۰/۳۸±۰/۰۰۳۸
مالون دی آلدئید (نانومول در میلی لیتر)	۳/۷۹±۰/۵۹	a۱/۲±۰/۱۷ ↓	۳/۹۷±۰/۵۳	۴/۴۲±۰/۶۷	۴/۱۳±۰/۳۲
سوپراکسیددیسموتاز (واحددرگرم هموگلوبین)	۲۳۸۰/۲۶±۲۵۷/۶۰	d۳۳۰۶/۷۸±۱۵۸/۱ ↑	۲۳۸۶/۹۶±۲۰۵/۵	۲۳۶۱/۶۴±۱۲۵/۶۷	۲۳۱۸/۴۶±۱۳۱/۳۴
گلوتاتیون پراکسیداز (واحد در گرم هموگلوبین)	۲۷/۲۶±/۱۹	a۳۱/۱۹±۰/۷۱ ↑	۲۷/۴۵±۰/۷۸	۲۷/۳۵±۰/۸۲	۲۷/۵±۰/۶۳
گلوتاتیون (میکرومول در لیتر)	۵/۴۱±۱/۶۴	a۱۵/۶۹±۰/۸۳ ↑	۱۲/۲۱±۰/۷۹	۱۰/۴۹±۱/۸۵	۹/۴۹±۱/۹
اینترلوکین ۱- بتا (پیکوگرم درمیلی لیتر)	۲۷/۴۸±۰/۱۸	a۲۳/۹±۰/۲۷ ↓	۲۷/۸±۰/۲۷	۲۷/۷۸±۰/۲۹	۲۸/۱۱±۰/۲۶
اینترلوکین ۶ (پیکوگرم درمیلی لیتر)	۷۳/۴۴±۰/۴۴	a۵۲/۹۴±۰/۵۱ ↓	۷۳/۷۹±۰/۳۳	۷۴/۲۵±۰/۴۵	۷۴/۵۶±۰/۵۶
★ TNF α (پیکوگرم درمیلی لیتر)	۵۸/۳۲±۰/۴	a۴۸/۳۴±۱/۳۱ ↓	۵۷/۷۸±۰/۵۸	۵۹/۴۲±۰/۴۲	۵۹/۱۸±۰/۴۲
★★ CRP (میکروگرم درمیلی لیتر)	۰/۳۹±۰/۰۲	a۰/۲۲±۰/۰۲ ↓	۰/۴۰±۰/۰۲	۰/۴۰±۰/۰۱	۰/۳۹±۰/۰۲

مقایسه ماین گروه ۱ و سایر گروهها صورت گرفته است.نتایج بصورت میانگین ± انحراف معیار (n= ۷) بیان شده است (a:p =۰.۰۰۱, b:p =۰.۰۰۴ , c:p =۰۰۰۹, d:p =۰.۰۰۲)

↑: افزایش فاکتور مورد نظر ↓ : کاهش فاکتور مورد نظر

★TNFα : Tumor Necrosis Factor-α ★ ★ CRP : C-Reactive Protein

www.SID.ir

جدول ۲. داده های طیف NMR پروتون و کربن ترکیب شماره یک

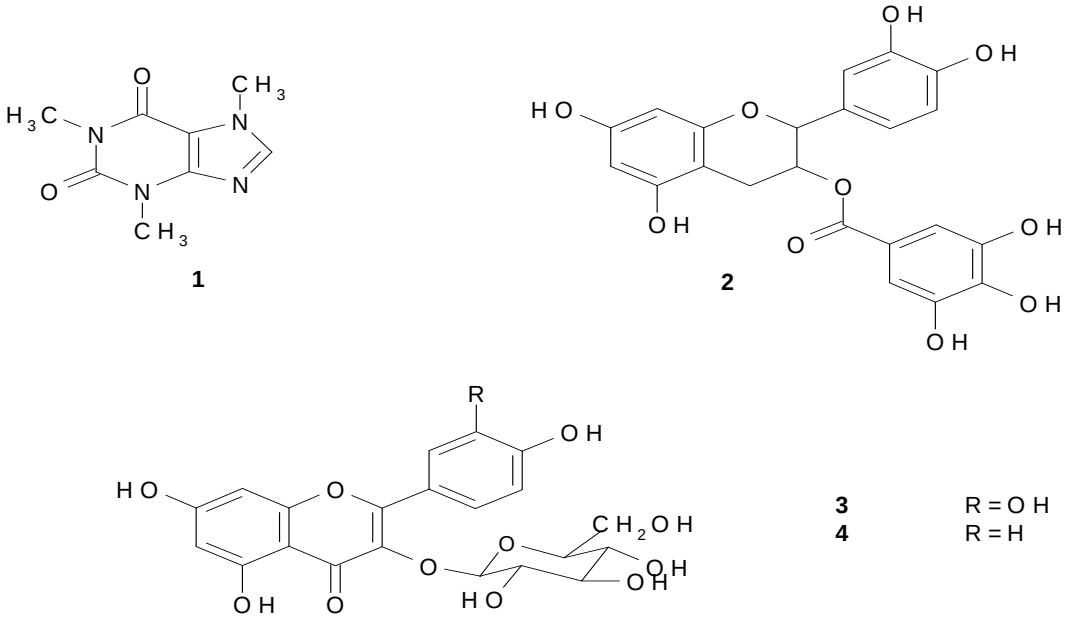
شماره کربن	$\delta_{ppm}(H)$	$\delta_{ppm}(C)$
۲	–	۱۵۲/۱۸
۴	–	۱۴۸/۷۵
۵	–	۱۰۷/۷۱
۶	–	۱۵۵/۶۳
۸	۷/۸۳s	۱۴۲/۹۴
CH_3(N-۱)	۳/۹۶s	۲۷/۲۷
CH_3(N-۳)	۳/۵۲s	۲۹/۱۷
CH_2(N-۱)	۳/۳۹s	۳۲/۹۶

جدول ۳. داده های طیف NMR ترکیبات شماره ۴-۲

شماره کربن	ترکیب شماره ۲		ترکیب شماره ۳	ترکیب شماره ۴
	$\delta H_{ppm}(J_{Hz})$	δC_{ppm}	$\delta H_{ppm}(J_{Hz})$	$\delta H_{ppm}(J_{Hz})$
۲	۵/۰۳*	۷۷/۶	–	–
۳	۵/۲۳*	۶۹/۰	–	–
۴	a: m۰۰ , ۳/b: m۲/۹۱	۲۵/۹	–	–
۵	–	۱۵۶/۸۴	–	–
۶	۵/۹۹s	۹۵/۵۶	۶/۲۵d(۲/۱)	۶/۲۱ d(۲)
۷	–	۱۵۶/۸	–	–
۸	۵/۹۹s	۹۵/۴۹	۶/۴۴d(۲/۱)	۶/۴۱d(۲)
۹	–	۱۵۹/۸۶	–	–
۱۰	–	۹۸/۴	–	–
۱′	–	۱۳۰/۵	–	–
۲′	۶/۹۸d(۲)	۱۱۴/۱	۷/۷۳d(۲)	۸/۱۱ d(۸/۸)
۳′	–	۱۴۵/۳۳	–	۶/۹۳d(۸/۸)
۴′	–	۱۴۴/۹۹	–	–
۵′	۶/۷۲d(۸/۱)	۱۱۵/۱	۶/۹۲d(۸/۴)	۶/۹۳d(۸/۸)
۶′	۶/۸۴dd (۸/۱و۲)	۱۱۸/۳۹	۷/۶۹dd(۸/۴و۲)	۸/۱۱ d(۸/۸)
۱″	–	۱۲۰/۵	۵/۱۲d(۷/۵)	۵/۱۲d(۷/۵)
۲″	۷/۰۸s	۱۰۹/۲۲	۳/۲-۳/۸*	۳/۲-۴*
۳″	–	۱۴۵/۳۳	۳/۲-۳/۸*	۳/۲-۴*
۴″	–	۱۳۸/۸	۳/۲-۳/۸*	۳/۲-۴*
۵″	–	۱۴۵/۳۳	۳/۲-۳/۸*	۳/۲-۴*
۶″	۷/۰۸s	۱۰۹/۲۲	۳/۲-۳/۸*	۳/۲-۴*
7''(C=O)	–	۱۶۶/۶۲	-	-

*Over Lapped Peaks

www.SID.ir



شکل ۱. ساختار شیمیایی ترکیبات ۴-۱ جدا شده از چای سیاه

۴- بحث

مطابق نتایج آزمایشات بیوشیمیایی انجام یافته، مؤثرترین فراکسیون تأثیرگذار بر فاکتورهای مورد مطالعه، فراکسیون ۲۰٪ می باشد (جدول ۱) لذا نسبت به آنالیز ترکیبات این فراکسیون اقدام گردید نتایج آنالیز ترکیبات در قسمت یافته ها حاکی از شناسایی ۴ ماده عمده در فراکسیون مذکور است که ساختار شیمیایی این ترکیبات با توجه به طیفهای NMR پروتون و کربن به شرح ذیل تعیین گردیدند. داده های طیف NMR پروتون ترکیب شماره یک در جدول ۲ حاکی از ساختار شیمیایی کافئین می باشد پیکهای تک شاخه با جابجایی شیمیایی ۷/۸۳ppm مربوط به پروتون کربن شماره ۸ و نیز سه گروه متیل مستقر در ازتهای شماره یک، ۳ و ۷ سه پیک تک شاخه با جابجایی شیمیایی به ترتیب در ۳/۹۶ppm، ۳/۵۲ppm و ۳/۳۹ppm می باشند همچنین جابجایی شیمیایی کربنهای ۲، ۴، ۵، ۶ و ۸ در مولکول کافئین به ترتیب در ۱۵۲/۱۸ppm، ۱۴۸/۷۵ ppm، ۱۰۷/۷۱ppm، ۱۵۵/۶۳ppm و ۱۴۲/۹۴ppm مشاهده می گردد و نیز سه گروه متیل موقعیتهای ۱، ۳ و ۷ به ترتیب در جابجایی های شیمیایی ۲۷/۲۷ppm، ۲۹/۱۷ppm و ۳۲/۹۶ppm مشاهده می گردد (جدول ۲). لذا از داده های طیفهای NMR پروتون و کربن، ساختمان شیمیایی کافئین تأئید می گردد. داده های طیف NMR پروتون ترکیب شماره ۲ در جدول۳ حاکی از پیک دو شاخه با جابجایی شیمیایی ۶/۹۸ppm با ثابت کوپلاژ ۲ هرتز مربوط به پروتون مستقر بر روی کربن شماره '۲ و نیز پیک دو شاخه با جابجایی شیمیایی ۶/۷۲ppm با ثابت کوپلاژ ۸/۱ هرتز مربوط به پروتون کربن'۵ و پیک دو شاخه، دو شاخه با جابجایی شیمیایی ۶/۸۴ppm با ثوابت کوپلاژ ۸/۱ و ۲ هرتز مربوط به پروتون '۶ بوده که با '۲ همپوشانی نموده است پیکهای چند شاخه با جابجایی شیمیایی ۳ppm و ۲/۹۱ppm مربوط به دو پروتون نامعادل کربن شماره ۴ می باشد همچنین پیک تک شاخه با جابجایی شیمیایی ۷/۰۸ppm و انتگراسیون دو پروتون مربوط به پروتونهای "2و "6 مولکول اسیدگالیک متصل به موقعیت ۳ اپی کاتچین می باشد از مجموع داده های NMR پروتون و نیز جابجایی شیمیایی کربنهای NMR که با داده های ارائه شده در منابع معتبر مطابقت دارد (۲۹) ساختار شیمیایی اپی کاتشین ۳-o گالات تأئید می گردد. داده های طیف NMR پروتون ترکیب شماره ۳ در جدول ۳ نشان دهنده دو پیک دو شاخه با جابجایی های شیمیایی ۶/۲۵ppm و ۶/۴۴ ppm و ثابت کوپلاژ ۲/۱ هرتز مربوط به پروتونهای ۶ و ۸ حلقه A و همچنین پیک دو شاخه با جابجایی شیمیایی ۷/۷۳ و ثابت کوپلاژ ۲ هرتز مربوط به پروتون '2 حلقه B و پیک دو شاخه با جابجایی شیمیایی ۶/۹۲ ppm و ثابت کوپلاژ ۸/۴ هرتز مربوط به پروتون '5 و

www.SID.ir

پیک دو شاخه دو شاخه با جابجایی شیمیایی ppm ۷/۶۹ و ثوابت کوپلاژ ۲ و ۸/۴ هرتز مربوط به پروتون '6 حلقه B فلاونوئید است.همچنین پروتون آنومریک قندی با جابجایی شیمیایی ۵/۱۲ و ثابت کوپلاژ ۷/۵ هرتز مشاهده میگردد. که نشان دهنده یک مولکول گلوکز در موقعیت ۳ میباشد. همچنین دیگر داده های طیف NMR پروتون درج شده در جدول ۳ ساختار کرستین ۳–o– گلوکوزید را تائید مینماید. داده های طیف HNMR ترکیب شماره ۴ در جدول ۳ حضور پیک های دو شاخه با جابجایی شیمیایی ppm۸/۱۱ و ppm۶/۹۳ با ثابت کوپلاژ ۸ هرتز حاکی از پروتونهای (۶′,۲′) و (۵′,۳′) حلقه B ترکیب فلاونوئیدی می باشد. همچنین دو پیک دو شاخه با جابجایی های شیمیایی ppm۶/۲۱ و ppm۶/۴۱ و ثابت کوپلاژ ۲ هرتز حاکی از به ترتیب پروتونهای ۶ و ۸ حلقه A فلاونوئید می باشد. بواسطه عدم حضور پروتون ۳ و نیز حضور پروتونهای قندی در ناحیه بین ppm۳ و ppm۴ و نیز پروتون آنومریک گلوکز که ایجاد یک پیک دو شاخه با جابجایی شیمیایی ppm۵/۱۲ و ثابت کوپلاژ ۷/۵ هرتز نموده است. نتیجه گیری می شود که هیدروکسیل موقعیت ۳ حامل یک مولکول گلوکز می باشد لذا با توجه به توضیحات فوق الذکر و مراجعه به جدول ۳ برای این ترکیب ساختار شیمیایی کامفرول ۳–o– گلوکوزید پیشنهاد می شود.

۵– نتیجه گیری

بر اساس نتایج مطالعه حاضر تجویز داخل صفاقی فراکسیون۲۰٪ حاصل از چای سیاه بر عوامل موثر دربروز و توسعه عوارض بیماری دیابت تاثیر مثبت دارد. با توجه به اینکه تا کنون مطالعه ای بر روی تا ثیر فراکسیونهای مختلف چای بر روی پارامترهای موثر در بروز دیابت صورت نگرفته است لذا یافته فوق از لحاظ فرمولاسیون ترکیب موثر چای، یافته جدید و نو تلقی می شود وتوصیه میگردد با رعایت ملاحظات اخلاقی اثر این فراکسیون به صورت خوراکی بر روی افراد دیابتی و غیر دیابتی انجام گیرد و در صورت نتایج مثبت ، نسبت به فرمولاسیون دارویی آن اقدام گردد.

۶– تقدیر و تشکر

از مرکز تحقیقات کاربردی دارویی بواسطه تا مین بود جه طرح ها با کد های: ۸۵/۱۰۷، ۸۵/۱۲۱۰ و مرکز حیوانات دانشگاه علوم پزشکی تبریز به خاطر همکاری صمیمانه در تامین رتهای مورد مطالعه نهایت تشکر را داریم.

References:

1. Ferdinando C., Ornella C., Roberto M. Cardio Vascular risk factors and disease management in type 2 diabetic patients with diabetic nephropatny. Diabe. Care, 2006, 29: 498-503.
2. Baydas G., Nedzvetskii V.S., Nerush P.A., Kirichenko S.V. Altered expression of NCAM in hippocampus and cortex may underlie memory and learning deficits in rats with streptozotocin – induced diabetes mellitus. Life scie., 2003, 3: 1907-16.
3. Gispen W.H., Biessels G.J. Cognition and synaptic plasticity in diabetes mellitus. Trends Neuroscie., 2000, 3(11): 542-549.
4. Wild S., Roglic G., Green A., Sicree R., Hilary K. Global prevalence of diabetes. Diabe. Care, 2004, 27(5) : 1046-52.
5. Raynuld B., Jun Y., John W. PPAR Agonism prevents the onset of type2 Diabetes in ZDF rats. Endocrino., 2006,10 : 1210-15.
6. Mojzisova G., Kuchta M. Dietary Flavonoids and Risk of Coronary heart disease. Physiol. Res., 2001, 50: 529-535.
7. Verena S., Mariol L., Karl S. Review: The role of tea and tea flavonoids in cardiovascular health. Mol. Nutr. Food Res., 2006, 50: 218 – 228.
8. Desiree C., Monica C., M Elena R.C., Ana Nieto., Maria D.L., Angel C., et al. The intestinal anti-inflammatory effect of quercitrin is associated with an inhibition in gene expression. Br. J. Pharmacol., 2004, 143: 908–918.
9. Comalada M., Camuesco D., Sierra S., Ballester I., Xaus J., Gálvez J., et al. In Vivo quercetin anti–inflammatory effect involves release of quercetin, which inhibitis inflammation through down – regulation of the NF – Kappa B pathway. Eur. J. Immunol., 2005, 35: 584-592.
10. Kawada N., Seki S., Inoue M., Kuroki T. Effect of antioxidants, resveratrol, quercetin, and N-acetylcysteine, on the functions of cultured rat hepatic stellate cells and Kupffer cells. Hepatology, 1998, 27: 1265-1274.
11. Middleton E. Jr. Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. Adv. Exp. Med. Biol., 1998, 439: 175 – 182.
12. Nair H.K., Rao K.V., Aalinkeel R., Mahajan S., Chawda R., Schwartz S.A. Inhibition of prostate cancer cell colony formation by the flavonoid quercetin correlates with modulation of specific regulatory gens. Clin. Diag. Lab. Immunol., 2004, 11: 63-69.
13. Nair M.P., Kandaswami C., Mahajan S., Chadha KC., Chawda R., Nair H., et al. The flavonoid quercetin, differentially regulates Th-1(IFN gamma) and Th-2 (IL4) cytokine gene expression by normal peripheral blood mononuclear cells. Biochim. Biophys. Acta., 2002, 1593: 29-36.

www.SID.ir

14. Wange J., Mazza G. Effects of anthocyanins and other phenolic compounds on the production of tumor necrosis factor alpha in LPS/IFN-gamma-activated RAW 264.7 macrophages. J. Agric. Food Chem., 2002, 50: 4183-4189.
15. Madhavan P.N., Supriya M., Jessica L.R., Ravikumar A., Harikrishnan N., Stanley A.S., et al. The flavonoid quercetin inhibits proin flammatory cytokine (Tumor Necrosis Factor Alpha) Gene expression in normal peripheral blood mononuclear cells via modulation of the NF – KB system. Clin. Vaccine Immunology, 2006, 13(3): 319-328.
16. Gupta S., saha B., Giri A.K. Comparative antimutagenic and anticlastogenic effects of green tea and black tea. Mutation Res., 2002, 512: 37-6528.
17. Okhovvat S.M.,Vakily D. Tea. Faraby Publishir,Tehran, IRAN.1999,16.
18. Amitabye L.R., Theeshan B., Alan C., Virginia Z., Krishna P D., David T D., et al. Characterization of the antioxidant functions of flavonoids and proanthocyanidins in Mauritian black teas. Food Res. Inter., 2005, 38: 357-367.
19. Kuo KL., Weng MS., Chiang CT., Tsai YJ., Lin-Shiau SY., Lin JK. Comparative Studies on the hypolipidemic and growth suppressive effects of Oolong, Black,Pu-erh, and Green tea leaves in rats. J Agric. Food Chem., 2005, 53: 480-489.
20. Kao Y.H., Chang H.H., Lee M.J., Chen C.L. Tea, Obesity and diabetes. Mol. Nutr. Food Res., 2006, 50: 188-210.
21. Vanessa C., Gary W. A review of the health effects of green tea catechins in inVivo animalmodels. J. Nutr., 2004, 134: 3431s-3440s.
22. Pon V., Kuruvimalai E., Chennam S. Therapeutic effect of green tea extract on advanced glycation and cross effect of green tea extract on advanced glycation and cross – linking of collagen in the aorta of streptozotocin glycation and cross – Linking of collagen in the aorta of streptozocin diabetic rats., Clin. Exp. Pharmaco. physiol., 2006, 33: 351 – 357.
23. Pon V., Kuruvimalai E., Chennam S. Therapeutic effect of green tea extract on oxidative stress in aorta and heart of streptozotocin diabetic rats. Chemico Biologi Interac., 2006, 162: 114 – 120.
24. Changrani N.R., Chonkar A., Adeghate E., Singh J. Effects of streptozotocin-induced type 1 diabetes mellitus on total protein concentrations and cation contents in the isolated pancreas,parotid,submandibular,and lacrimal glands of rats. Ann. N. Y. Acad. Sci., 2006 , 1084: 503-19 .
25. Anton R., Sheil W. Antioxidant effects of tea: Evidence from human Clinical trials. J. Nutr., 2003, 133: 3285s – 3292s.
26. Balz F., Jane V. Antioxidant activity of tea polyphenols in vivo: evidence from animal studies. J. Nutr., 2003, 133: 3275s – 3284s.
27. Sabu M., Smitha K., Ramadasan K. Anti – diabetic activity of green tea polyphenols and their role in reducing oxidative stress in experimental diabetes. J Ethno pharmaco. 2002, 83(1-2): 109-116.
28. Yung K., Richardo H., Shutsung L. Modulation of endocrine systems and food in take by green tea epigallocatechin gallate. Endocrino., 2000, 141(3): 980-987.
29. Khallouki F.,Haubner R.,Hull W E.,Erben G.Isolation ,Purification and identification of ellagic acid derivatives,catechins,and procyanidins from the root bark of Anisophyllea dichostyla R Br.Food Chimical Toxicol.,2007,45:427-485.

www.SID.ir