بررسی تأثیر حلال مصرفی، خوراک ورودی و روش روغن‌گیری در تهیه عصاره استاندارد شده سیلی‌مارین

رضا حاجی‌آقایی[1]*، شمسعلی رضازاده[1]، رضا غفارزادگان[1]، آمنه محمدنژاد[1]

۱- مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی، جهاد دانشگاهی، کرج، ایران

* آدرس مکاتبه: کرج، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی، صندوق‌پستی: ۳۶۹-۳۱۳۷۵

تلفن: ۱۸-۳۴۷۶۴۰۱۰ (۰۲۶)، نمابر: ۳۴۷۶۴۰۲۱ (۰۲۶)

پست الکترونیک: rhajiaghaee@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۶/۷/۲۴ **تاریخ تصویب:** ۹۷/۳/۲۳

چکیده

مقدمه: گیاه خارمریم (***Silybum marianum***) گیاهی یکساله یا دو ساله بومی نواحی مدیترانه‌ای است که در سراسر دنیا به صورت کاشته شده یافت می‌شود. عصاره تهیه شده از بذرهای این گیاه برای درمان بیماری‌های کبد از زمان باستان مورد استفاده بوده است. ترکیبات شاخص این گیاه دارویی ترکیبات فلاونولیگنانی هستند که از سیلی‌بین به عنوان مهم‌ترین آنان یاد می‌شود.

هدف: هدف از این مطالعه بررسی اثر انواع خوراک ورودی، نوع حلال مصرفی و نوع روش روغن‌گیری بذرها در فرآیند تهیه عصاره از بذر گیاه خارمریم بوده است.

روش بررسی: در این مطالعه از روش استخراج با رفلاکس ساده جهت تهیه عصاره استفاده شد. طول مدت زمان استخراج برای تمام نمونه‌ها شش ساعت و دما نیز در $60^{\circ}C$ ثابت در نظر گرفته شد. انواع خوراک ورودی شامل دانه کامل آسیاب شده، تفاله روغن‌گیری شده با حلال، تفاله روغن‌گیری شده به روش پرس سرد و پریکارپ جدا شده از بذرها تهیه و وارد سیستم استخراج شد. همچنین، سه حلال مختلف شامل: اتانول ۸۰ درصد، متانول و متانول ۸۰ درصد در نظر گرفته شد. عصاره‌های تهیه شده توزین شده و به منظور تعیین کمی مقدار سیلی مارین از دستگاه **HPLC** استفاده شد.

نتایج: بر اساس داده‌ها، غلظت و مقدار سیلی مارین در عصاره‌های تهیه شده مقایسه شد. عصاره تهیه شده با خوراک بذر کامل و حلال متانول بیشترین مقدار ماده مؤثره را استخراج نمود در حالی که بالاترین غلظت سیلی‌مارین در عصاره تهیه شده با خوراک ورودی پریکارپ بذر و حلال اتانول ۸۰ درصد حاصل شد.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این مطالعه به خوبی نشان می‌دهد، با استفاده از بذر کامل و حلال متانول می توان مقدار بیشتری ماده مؤثره را استخراج نمود که البته این امر به قیمت ناخالصی بیشتر در عصاره خواهد بود.

گل‌واژگان: خارمریم، حلال عصاره‌گیری، خوراک ورودی، سیلی‌مارین، عصاره استاندارد

مقدمه

گیاه دارویی خارمریم با نام علمی (*Silybum marianum*) از نظر سیستماتیک گیاهی متعلق به رده دولپه‌ای‌ها، راسته گل مینا و از تیره کاسنی می‌باشد. خارمریم گیاهی یکساله یا دوساله است که دارای ریشه ضخیم و ساقه‌ای منشعب- کرکی و به رنگ قهوه‌ای کمرنگ می‌باشد. ارتفاع ساقه این گیاه ۱۵۰ تا ۲۵۰ سانتی متر است. برگ‌های این گیاه پهن و به حالت نیزه اطراف گیاه قرارگرفته و پراکندگی آن معمولاً چندبرگی یا دوبرگی است. گل دارای کاپیتول‌های درشت منفرد و شامل گل‌های لوله‌ای به رنگ ارغوانی و به ندرت سفیدرنگ است. میوه فندقه- صاف و به رنگ قهوه‌ای بوده و در انتهای آن تارهایی به نام پاپوس وجود دارد. گیاه خارمریم در مناطق مدیترانه‌ای و در جلگه‌های هموار با آب و هوای گرم و در خاک‌های سبک شنی می‌روید و در مناطق گوناگونی از ایران نیز مانند گرگان، کرمانشاه، لرستان، خوزستان و فارس رویش دارد [۱].

حدود ۲۰۰۰ سال است که از عصاره خارمریم به عنوان یک داروی گیاهی استفاده می‌شود. شاید بتوان گفت قدیمی‌ترین و شناخته شده‌ترین مصرف درمانی این گیاه دارویی در درمان بیماری های کبدی مانند سیروز، هپاتیت ویروسی و سمی مزمن، کبدچرب و التهاب مجرای صفرا می‌باشد [۲]. نتایج تحقیقات بالینی اخیر نیز نشان می‌دهد سیلی‌مارین می‌تواند به عنوان کاهنده کلسترول خون در بیماران با کلسترول خون بالا مطرح شود [۳]. همچنین سیلی مارین از طریق اثرات آنتی‌اکسیدانی موجب محافظت لوزالمعده، کلیه‌ها و سلول‌های عصبی در برابر عوارض ناشی از دیابت می‌شود [۴].

اولین مطالعات جهت جداسازی ترکیبات مؤثره دانه‌ها در سال ۱۹۵۸ انجام شد. تقریباً یک دهه بعد، در مطالعه‌ای که توسط آقای Wagner در دانشگاه مونیخ انجام گرفت سیلی‌مارین جداسازی شد. در آن زمان تصور شد سیلی‌مارین تنها یک ترکیب منفرد می‌باشد اما با پیشرفت و توسعه روش‌های جداسازی مشخص شد که سیلی‌مارین تنها یک ترکیب نیست بلکه دسته‌ای از ترکیبات پیچیده فلاونولیگنان می‌باشد [۵].

ترکیب سیلی‌مارین که ماده‌ی فعال عصاره‌های استخراج شده از میوه‌های گیاه خارمریم است، در واقع ترکیب پیچیده‌ای از هفت فلاونولیگنان، فلاونول و تاکسی‌فولین می‌باشد که ۸۰-۶۵ درصد وزنی بخش (fraction) سیلی‌مارینی را تشکیل می دهند و مابقی ترکیبات مرتبط و مشابه شناخته نشده گزارش شده است [۷، ۶]. بر اساس فارماکوپه‌ی آمریکا و اروپا، از میوه‌های بالغ این گیاه حداقل ۲-۱/۵ درصد عصاره سیلی‌مارینی استاندارد شده استخراج می‌شود. عصاره‌های تجاری تهیه شده از این گیاه که در بازار موجود هستند، عموماً حاوی ۸۰-۷۰ درصد سیلی‌مارین می باشند. هفت ترکیب فلاونولیگنانی عمده عبارتند از: سیلی‌بین A و B، ایزوسیلی بین A و B، سیلی کریستین، ایزوسیلی کریستین، و سیلی دیانین. این هفت ترکیب به همراه تاکسی‌فولین که در واقع کوئرستین احیا شده است به عنوان ترکیبات شاخص جهت مطالعات کمی عصاره‌های استاندارد شده، معرفی شده‌اند. اخیراً ترکیبات سیلی‌کریستین B، ایزوسیلی‌بین C، و ایزوسیلی‌بین D، نیز به عنوان اجزای کمتر شناخته‌ی ترکیبات سیلی‌مارینی معرفی شده اند [۹، ۸].

عصاره‌های تهیه شده از این گیاه دارویی اهمیت اقتصادی زیادی هستند. در سال ۲۰۱۴ مکمل‌های تهیه شده از این گیاه در بازار فروش مکمل‌های طبیعی با فروش ۹/۲ میلیون دلار رتبه‌ی ششم را در میان ۲۰ گیاه پرفروش کسب کرد. همچنین در بازار آمریکا مکمل‌های تغذیه‌ای تهیه شده از این گیاه از بین ۵۰ مکمل گیاهی پرفروش، با فروش ۱۶/۴ میلیون دلار در جایگاه دوازدهم قرار گرفت. لذا مطالعه فرآیند استخراج و تهیه عصاره غنی از سیلی‌مارین با توجه به گردش مالی بازار مصرف جایگاه ویژه‌ای دارد [۱۰]. بر اساس مطالعات ذکر شده در اکثر منابع [۱۱]، پیش ماده‌های بیوسنتز فلاونولیگنان‌های خارمریم دو ترکیب تاکسی فولین و کونیفریل می‌باشند. کونیفریل الکل پیش‌ساز لیگنین بوده و محتملاً به اجزای دیواره‌ی سلولی مرتبط می‌باشد [۱۲]. مطالعات فیتوشیمیایی نیز این نتایج را تأیید می‌کند، چرا که فلاونولیگنان‌ها غالباً از پوشش‌های خارجی بذرها استخراج و شناسایی شده‌اند [۱۲]. از سوی دیگر دانه‌های این گیاه حاوی مقادیر زیادی روغن (حدود ۲۵-۲۰ درصد) هستند [۱۳] که شامل فسفولیپیدهای ضروری به همراه مقادیر بالایی از اسیدهای

چرب اشباع نشده نظیر اولئیک اسید، لینولئیک اسید و نیز ویتامین E می‌باشند [۱۴، ۱۳]. البته این روغن به عنوان یک محصول جانبی نامطلوب در فرآیند تهیه عصاره استاندارد شده‌ی سیلی مارین بوده و احتیاج است که قبل از استخراج این روغن خارج شود. لذا به منظور تهیه‌ی عصاره استاندارد، مرحله‌ی چربی‌زدایی مقدم بر استخراج بوده و با حلال‌های بسیار چربی‌دوست مانند هگزان و یا پترولیوم اتر انجام می‌شود. بنابراین، فارماکوپه‌ی اروپا فرایندی دو مرحله‌ای را برای استخراج سیلی‌مارین توصیه کرده است. به این ترتیب که بذرها در ابتدا به مدت ۶ ساعت با حلال هگزان چربی‌زدایی شده، سپس استخراج با متانول به مدت ۵ ساعت و یا بیشتر انجام می‌شود.

با توجه به آنچه گفته شد پرواضح است که استفاده از خوراک ورودی مناسب به گونه‌ای که بتواند محتوی روغنی عصاره استحصالی را به حداقل ممکن برساند بسیار مهم می‌باشد. به همین علت، در این مطالعه، کارایی روش‌های مکانیکی روغن‌گیری از بذرها با روش روغن‌گیری با حلال با هم مقایسه شده‌اند. حذف فیزیکی بافت روغنی با جداکردن پریکارپ بذر از هسته روغنی نیز به عنوان جایگزین فرآیند روغن‌گیری درنظر گرفته شده و نتایج با استخراج از بذر کامل به عنوان خوراک ورودی مقایسه شده است. همچنین با توجه به آنکه حلال استخراج‌گر نقش تعیین‌کننده‌ای در استخراج ترکیبات طبیعی ایفا می‌کنند، لذا در این پژوهش، حلال‌های متانول، اتانول ۸۰ درصد و متانول ۸۰ درصد در استخراج ترکیبات مؤثره سیلی‌مارینی از بافت گیاهی مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی

در این مطالعه از حلال‌های متانول و نرمال هگزان محصول شرکت Daejung و اتانول محصول شرکت کیمیا الکل زنجان استفاده شد. به منظور تعیین کمی مقدار سیلی‌مارین موجود در عصاره‌ها از استاندارد سیلی‌مارین و سیلی‌بین محصول شرکت Sigma استفاده شد. سایر حلال‌های مورد استفاده در بخش تعیین مقدار با درجه خلوص آنالیز و از شرکت Merck تهیه شد.

تهیه و جمع‌آوری نمونه گیاهی

بذرهای گیاه خارمریم مورد استفاده در این مطالعه از مزرعه گیاهان دارویی پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی با کد MPI SB ۹۴۱ تهیه شد.

انواع روش‌های روغن‌گیری از بذرها و تهیه انواع خوراک ورودی

برای انجام این مطالعه، روغن‌گیری از دانه‌ها به دو روش انجام گرفت. روش اول بر اساس فارماکوپه انجام شد. به این ترتیب که بذر کامل خارمریم توزین و آسیاب شد و سپس وارد سیستم سوکسله شد. ماده گیاهی به مدت شش ساعت با حلال نرمال هگزان چربی‌زدایی شد. مقدار روغن جدا شده بعد از حذف کامل حلال توزین شد.

روش دوم استفاده از روش متداول و رایج پرس سرد بود. در این روش نیز بذر کامل توزین شده و به روش پرس سرد روغن‌گیری شد. روغن و تفاله به دست آمده، توزین شد. این تفاله‌ها نیز به صورت مناسبی آسیاب شده و از آن جهت انجام آزمایش‌های بعدی استفاده شد.

منظور تهیه خوراک از پریکارپ بذرها، بذر کامل به مدت ۲۴ ساعت در آب مقطر خیسانده شده و سپس آبکشی شد. دانه های خیس خورده در مرحله بعد به صورت مکانیکی با یک وردنه چوبی تحت فشار قرار گرفتند تا هسته روغنی از پوسته جدا شود. دانه‌های شکسته شده در معرض هوا خشک شدند. پس از خشک شدن کامل، پوسته چوبی جدا شده از هسته روغنی به صورت فیزیکی با دست جدا و آسیاب شد. بذرهای کامل آسیاب شده نیز به عنوان یک خوراک ورودی به منظور مقایسه نتایج در نظر گرفته شد.

عصاره‌گیری از نمونه‌ها

جهت عصاره‌گیری از بذرها از روش رفلاکس حرارتی ساده که روش پرکاربردی در صنایع عصاره‌گیری است استفاده شد. به منظور همگن‌سازی حرارت، ظرف استخراج در حمام آب گرم در دمای ^{o}C ۶۰ قرار گرفت. وزن موردنظر از ماده گیاهی به سیستم استخراج وارد شد و به مقدار بیست برابر حلال به آن اضافه شد (جدول شماره ۱). استخراج به مدت

جدول شماره ۱- عصاره‌گیری از نمونه‌ها

شماره آزمایش	خوراک ورودی	وزن خوراک ورودی (گرم)	نوع حلال	حجم حلال (میلی‌لیتر)	کد عصاره
۱	پریکارپ	۶/۲۵	اتانول ۸۰٪	۱۲۵	PE
۲	پریکارپ	۶/۲۵	متانول	۱۲۵	PM
۳	تفاله روغن‌گیری با پرس سرد	۸	اتانول ۸۰٪	۱۶۰	TE
۴	تفاله روغن‌گیری با پرس سرد	۸	متانول	۱۶۰	TM
۵	دانه‌ی کامل	۱۰	اتانول ۸۰٪	۲۰۰	BEA
۶	دانه‌ی کامل	۱۰	متانول	۲۰۰	BM
۷	دانه‌ی کامل	۱۰	متانول ۸۰٪	۲۰۰	BMA
۸	تفاله روغن‌گیری با حلال	۷/۷	اتانول ۸۰٪	۱۵۴	TEA
۹	تفاله روغن‌گیری با حلال	۷/۷	متانول	۱۵۴	TPM
۱۰	تفاله روغن‌گیری با حلال	۷/۷	متانول ۸۰٪	۱۵۴	TMA

شش ساعت در شرایط رفلاکس انجام گرفت و عصاره حاصل با کاغذ صافی فیلتر شد. سپس عصاره به کمک دستگاه روتاری تغلیظ شده و عصاره خشک حاصل شده توزین شد.

روش تعیین مقدار با استفاده از HPLC

۱۰ میکرولیتر از نمونه‌ها و استاندارد به دستگاه HPLC شرکت Knauer با مشخصات پمپ مدل K 1001، دتکتور UV مدل K2501 و نرم‌افزار Chromgate جهت انتگرال‌گیری از پیک‌ها تزریق شد. فاز متحرک با استفاده از سیستم گرادیان حلال های آب، متانول و فسفریک اسید با سرعت جریان ۰/۸ میلی‌لیتر بر دقیقه از ستون به مشخصات C_{18} YMC ODSAQ column (2.0 mm × 100 mm, 3, 120 A°) عبور کرد. جذب نمونه‌ها در طول موج ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

نتایج

بازده روغن‌گیری

جهت حذف روغن از بافت دانه‌ها، روغن‌کشی به دو روش انجام گرفت. روش اول روغن‌گیری به روش توصیه شده در فارماکوپه با حلال هگزان نرمال بود. دانه کامل بعد از آسیاب شدن با حلال هگزان نرمال روغن‌گیری شد که درنهایت از ۳۰ گرم دانه‌ی آسیاب شده ۶/۳۷ گرم روغن حاصل شد. در واقع روغن استخراج شده ۲۱/۲۴ درصد وزن دانه‌ها را تشکیل می‌دهد. روش دوم به کار گرفته شده در این پژوهش، پرس سرد بود. مقدار ۲۰۰ گرم بذر کامل به دستگاه روغن‌گیری با روش پرس سرد وارد شد که ۴۰ گرم روغن و ۱۶۰ گرم تفاله از فرآیند روغن‌گیری حاصل شد. به این ترتیب میزان روغن استخراج شده از دانه‌ها ۲۰ گرم وزن دانه بود.

بازده استخراج، تعیین غلظت بخش سیلی‌مارینی و سیلی‌بین در عصاره

عصاره‌های تهیه شده با انواع خوراک ورودی و انواع حلال ها کاملاً خشک شده بازده استخراج از روی وزن عصاره خشک به دست آمده و وزن خوراک ورودی محاسبه شد. با توجه به نتایج آنالیز HPLC غلظت سیلی‌مارین و سیلی‌بین در عصاره های به دست آمده، تعیین شده و مقدار وزنی مواد مؤثره موردنظر که در شرایط مختلف استخراج شده‌اند نیز با درنظرگرفتن بازده استخراج و غلظت عصاره‌ها محاسبه شد. نتایج در جدول شماره ۲ آورده شده است.

جدول شماره ۲- بازده استخراج، غلظت مواد مؤثره در عصاره‌ها و مقدار ترکیبات موردنظر استخراج شده

کد عصاره	وزن عصاره خشک (گرم)	سیلی‌مارین (درصد)	سیلی‌بین (درصد)	مقدار سیلی‌مارین (گرم)	مقدار سیلی‌بین (گرم)
PE	۰/۵۰۵	**۴۳/۴۹۷**	**۸/۲۴**	۰/۲۱۹	۰/۰۴۱
TE	۰/۳۱۵	۲۷/۵۸۵	۵/۳۸۹	۰/۰۸۷	۰/۰۱۷
PM	۰/۶۴۷	۲۱/۷۴۰	۴/۴۹۲	۰/۱۴۱	۰/۰۲۹
TPM	۱/۰۵۴	۱۶/۵۳۹	۳/۲۷۵	۰/۱۷۴	۰/۰۳۵
BEA	۱/۱۶۲	۱۵/۰۹	۲/۸۵	۰/۱۷۵	۰/۰۳۳
BMA	۰/۸۷۲	۱۷/۷۴	۳/۳۲	۰/۱۵۵	۰/۰۲۹
BM	**۱/۴۷۴**	۱۶/۵۱	۳/۰۳	**۰/۲۴۳**	**۰/۰۴۵**
TEA	۰/۷۸۱	۲۲/۲۶	۴/۱۶	۰/۱۷۳۷	۰/۰۳۳
TMA	۰/۸۱۹	۲۰/۱۹	۳/۷۳	۰/۱۶۵	۰/۰۳
TM	۰/۶۳۸	۲۴/۱۷	۴/۴۷	۰/۱۵۴	۰/۰۲۹

بحث

با در نظر گرفتن درصد بالای محتوای روغنی بذرها، روغن گیری به عنوان مرحله‌ای اجتناب‌ناپذیر در تهیه عصاره استاندارد قلمداد می‌شود. در مطالعه حاضر دو روش روغن‌گیری از جهت کارایی در بهبود فرآیند تهیه عصاره استاندارد مقایسه شده‌اند. داده‌های جدول شماره‌های ۳ و ۴ مقدار و غلظت ماده مؤثره به دست آمده از عصاره‌های اتانولی و متانولی تهیه شده از بذرهای روغن‌گیری شده به صورت مکانیکی (TE) و روغن‌گیری شده با حلال (TEA) را نشان می‌دهد. در عصاره‌های تهیه شده از بذر روغن‌کشی شده با حلال(TEA, TPM)، مقدار عصاره استخراج شده به مقدار چشمگیری (حدوداً دو و نیم برابر) بیشتر از عصاره‌های تهیه شده از بذر روغن‌کشی شده به روش پرس سرد (TE, TM)، بوده است. با این وجود، غلظت ترکیبات سیلی مارین و سیلی‌بین در عصاره‌های تهیه شده از بذرهای روغن گیری شده با حلال (TEA, TPM)، پایین‌تر از غلظت این ترکیبات در عصاره‌های تهیه شده از بذرهای روغن‌کشی شده به روش پرس سرد (TE, TM)، است. بنابراین، در روش روغن گیری با حلال، روغن به صورت کامل از بذرها حذف نمی‌شود و با حضور خود در عصاره باعث کاهش میزان درصد سیلی مارین و سیلی‌بین می‌شود.

در منابع از انواع پیش‌تیمارهای بذر به عنوان جایگزینی برای مرحله‌ی چربی‌زدایی استفاده شده است. در یک مطالعه، بذرهای گیاه خارمریم با محلول‌های NaOH (۱/۲ درصد وزنی)، H_2SO_4 (۱/۵ درصد وزنی)، $NaHCO_3$ (۲ درصد وزنی) و ۱۴ درصد آنزیم سلولاز پیش تیمار شدند. نتایج این مطالعه نشان می دهد پیش تیمار دانه‌ها با محلول ۱/۵ درصد وزنی از H_2SO_4 در دمای ۵۰ درجه به مدت ۱۸ ساعت می‌تواند جایگزین پیش‌تیمار با پترولیوم اتر شود. علت آن است که در این محلول‌ها به علت تسریع و تسهیل تخریب دیواره‌ی سلولی سلولزی بافت گیاهی، استخراج ترکیبات از داخل سلول با حلال بهبود می‌یابد [۱۶].

کارایی انواع پیش‌تیمارهای جایگزین روغن‌گیری و انواع روش‌های استخراج مانند رفلاکس، سوکسله، خیساندن و استخراج با امواج مایکروویو نیز در مطالعه‌ای مقایسه شده‌اند. در این مطالعات حلال متانول، حلال استخراج‌گر مناسب‌تر و استخراج به روش سوکسله و نیز استخراج به کمک امواج مایکروویو بهترین روش گزارش شده است [۱۷].

جدول شماره ۳ – مقایسه تأثیر روش‌های روغن‌گیری بر استخراج مواد مؤثره از تفاله با حلال اتانول ۸۰ درصد

	درصد وزنی	مقدار (میلی‌گرم)	کد عصاره
سیلی‌مارین	۲۷/۵	۸۷	TE
	۲۲/۲۶	۱۷۳	TEA
سیلی‌بین	۵/۳۸	۱۳	TE
	۴/۱۶	۳۳	TEA

جدول شماره ۴ – مقایسه تأثیر روش‌های روغن‌گیری بر استخراج مواد مؤثره از تفاله با حلال متانول

	درصد وزنی	مقدار (میلی‌گرم)	کد عصاره
سیلی‌مارین	۲۴/۱۷	۱۵۴	TM
	۱۶/۵۳	۱۷۴	TPM
سیلی‌بین	۴/۴۷	۲۹	TM
	۳/۲۷	۳۵	TPM

استفاده از خوراک ورودی مختلف و همچنین انواع حلال نیز تأثیر فراوانی بر کیفیت عصاره از لحاظ ترکیب درصد مواد مؤثره دارد. با توجه به این داده‌های جدول شماره ۲ نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد، غلظت سیلی‌مارین بر حسب درصد وزنی در عصاره‌ها به ترتیب زیر افزایش می‌یابد:

PE > TE > TM > TEA > PM > TMA > BMA > TPM > BM > BEA

همچنین ترتیب افزایش غلظت وزنی سیلی‌بین در عصاره‌ها به صورت زیر است:

PE > TE > PM > TM > TEA > TMA > TPM > BMA > BM > BEA

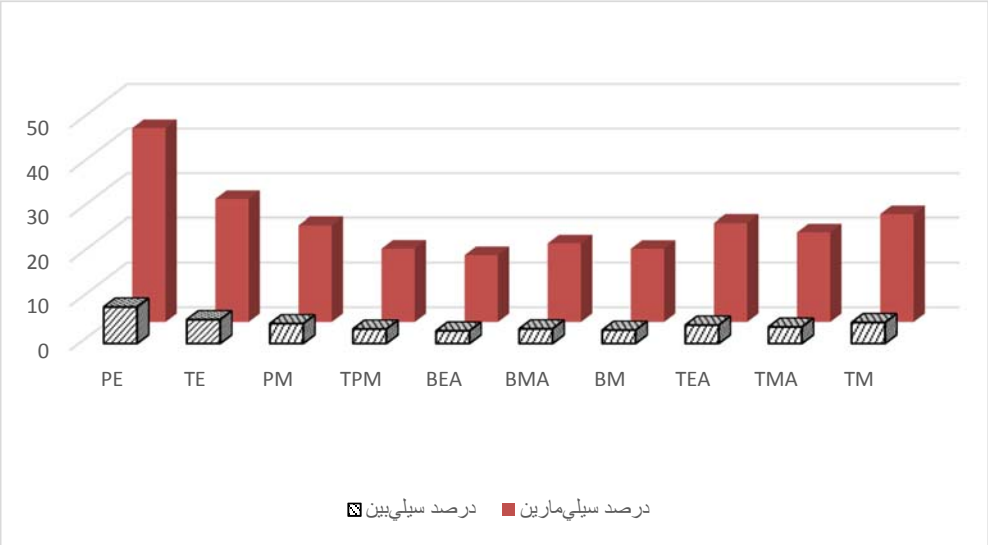
این داده‌ها نشان می‌دهد خوراک ورودی به صورت پریکارپ جدا شده از بذر کامل و تفاله روغن‌گیری شده به صورت مکانیکی با حلال اتانول به صورت مؤثر ترکیبات برخه سیلی‌مارینی را استخراج می‌کنند (نمودار شماره ۱). با توجه به بازده وزنی استخراج و غلظت عصاره‌ها، میزان ماده مؤثره استخراج شده برحسب گرم نیز محاسبه شد. با درنظر گرفتن داده‌ها روند افزایشی مشاهده شده در عصاره‌ها برای مقدار سیلی مارین به صورت زیر است (نمودار شماره ۲):

BM > PE > BEA > TPM > TEA > TMA > BMA > TM > PM > TE

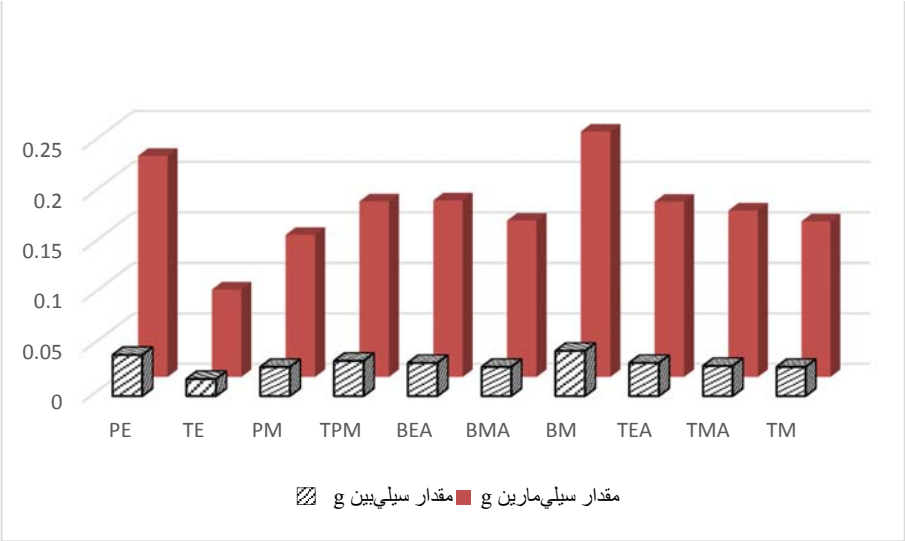
و نیز مقدار سیلی‌بین در عصاره‌ها با روند زیر افزایش یافته است:

BM > PE > TPM > BEA >TEA > TMA > BMA> PM > TM > TE

که مشابهت زیادی با ترتیب مقدار سیلی‌مارین استخراج شده دارد. تأثیر دما برروی استخراج سیلی‌مارین از دانه‌های روغن گیری شده و روغن‌گیری نشده با حلال‌های مختلف نیز مورد مطالعه قرار گرفته است. در اکثر موارد حلال اتانول در دمای °C ۶۰ بالاترین بازده را دارد. البته آب جوش برای استخراج ترکیبات قطبی‌تر مثل تاکسیفولین و سیلی کریستین انتخاب مناسب‌تری است [۱۸]. همچنین در مطالعه‌ای بازده استخراج از بذرهای روغن‌گیری شده و روغن‌گیری نشده با



نمودار شماره ۱- مقایسه غلظت سیلی‌مارین و سیلی‌بین در انواع عصاره‌های استحصالی



نمودار شماره ۲- مقایسه مقدار سیلی‌مارین و سیلی‌بین در انواع عصاره‌های استحصالی

حلال‌های اتانول، متانول، استونیتریل و استون با یکدیگر مقایسه شد. بازده استخراج از دانه‌های روغن‌گیری شده حدوداً دو برابر و حلال متانول بالاترین بازده استخراج سیلی‌بین A نسبت به سیلی‌بین B را داشت [۱۹]. ذخیره‌سازی ترکیبات سیلی‌مارینی در بافت دانه‌ی گیاه خارمریم و استخراج هدفمند آن نیز توسط محققان بررسی شده است. ویژگی‌های فیزیکی و محل ذخیره سازی فلاونوئیدها و چربی‌ها مطالعه شده، از روش استخراج با سوکسله [۱۲] و روش استخراج با حلال تسریع شده (accelerated solvent extraction) و یا ASE [۲۰] جهت استخراج استفاده شده است. نتایج این مطالعات نشان می‌دهد عمده‌ی ترکیبات سیلی‌مارینی در پوسته‌ی دانه گیاه ذخیره شده است.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این مطالعه به خوبی نشان می‌دهد استفاده از خوراک ورودی پریکارپ بذرها در صورتی که تنها یک مرحله استخراج و تهیه عصاره مطلوب باشد گزینه مناسب‌تری است، اما در صورتی که عصاره تهیه شده وارد مراحل بعدی جهت جداسازی ترکیبات سیلی‌مارینی شود، استفاده از بذر کامل انتخاب مناسب‌تری خواهد بود. حلال اتانول ۸۰ درصد می‌تواند به صورت انتخابی ترکیبات سیلی‌مارینی را استخراج کند، اما از آنجا که متانول قابلیت حل کردن طیف وسیعی از ترکیبات را دارد بازده استخراج عصاره‌های متانولی بیشتر است. در نتیجه با استفاده از حلال متانول می‌توان مقدار بیشتری ماده مؤثره را استخراج نمود که البته این امر به قیمت ناخالصی بیشتر در عصاره تمام خواهد شد.

منابع

1. Mozaffarian V. Identification of medicinal and aromatic plants of Iran. Tehran: Farhang Moaser Publishers, 2013.

2. Flora K, Hahn M, Rosen H and Benner K. Milk thistle (*Silybum marianum*) for the therapy of liver disease. *Am. J. Gastroenterol.* 1998; 93 (2): 139 - 143.

3. Cancer P. T and Yarnell E. The Many Faces of *Silybum marianum* (Milk Thistle). *Altern. Complement. Ther.* 2003; 5: 170 - 175.

4. Kazazis C. E, Evangelopoulos A. A, Kollas A and Vallianou N. G. The therapeutic potential of milk thistle in diabetes. *Rev. Diabet. Stud.* 2014; 11 (2): 167 - 174.

5. Theodosiou E, Purchartová K, Stamatis H, Kolisis F and Křen V. Bioavailability of silymarin flavonolignans: Drug formulations and biotransformation. *Phytochem. Rev.*, 2014; 13 (1): 1 -18.

6. Abouzid S and Ahmed O. M. Silymarin flavonolignans: Structure-activity relationship and biosynthesis. *Stud. Nat. Prod. Chem.* 2013; 40: 469 - 484.

7. Elwekeel A, Elfishawy A and AbouZid S. Silymarin content in *Silybum marianum* fruits at different maturity stages. *J. Med. Plants Res.* 2013; 7 (23): 1665 - 1669.

8. Smith W. A., Lauren D. R., Burgess E. J., Perry N. B. and Martin R. J. A silychristin isomer and variation of flavonolignan levels in milk thistle (*Silybum marianum*) fruits *Planta Med.* 2005; 71 (9): 877–880.

9. Sy-Cordero A. *et al.* Large-scale isolation of flavonolignans from *Silybum marianum* extract affords new minor constituents and preliminary structure-activity relationships *Planta Med.* 2010; 76 (6): 644 - 647.

10. Smith M. B. T, Lynch ME, Johnson J, Kawa K, Bauman H. Herbal dietary supplement sales in US increase 6.8% in 2014. *HerbalGram* 2015; 107: 52 - 59.

11. Cappelletti E. M. and Caniato R. Silymarin localization in the fruit and seed of *Silybum marianum* L.Gaertn. *Herba Hung.* 1984; 23: 53 - 66.

12. I. B. S. Stoiljković Zora Ž.a, Petrović Slobodan D.b. Examination of localization of silymarin and fatty oil in *Silybum marianum* (L.) Gaertn. Fruit. *Chem. Ind. Chem. Eng. Q.*, 2007; 13: 55 - 59.

13. Sabir M. N. and Rachid S. K. Comparative Analysis of the Fatty Acid Pattern of *Silybum marianum* with *Nigella sativa* by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Iraqi J. Pharm. Sci*. 2013; 22 (1): 25 - 31.

14. Hadolin M., Skerget M., Knez Z. and Bauman D. High pressure extraction of vitamin E-rich oil from *Silybum marianum*. *Food Chem.* 2001; 74 (3): 355 - 364.

15. Harrabi S., Romdhane H., Daassa M. and Fellah H. Fatty acid and triacylglycerol compositions of milk thistle seeds growing wild in Tunisia (*Silybum marianum* L.) *Acta Aliment.* 2015; 44 (2): 304 - 310.

16. Subramaniam S., Vaughn K., Carrier D. J. and

Clausen E. C. Pretreatment of milk thistle seed to increase the silymarin yield: An alternative to petroleum ether defatting. *Bioresour. Technol.* 2008; 99 (7): 2501 - 2506.

17. Jahan N., Rahman K.-, Basra S. M. A., Sajid S. and Afzal I. Seed Enhancement of *Silybum marianum* and Optimization of Silymarin Extraction *Int. J. Agric. Biol.* 2016; 18 (2): 464 -470.

18. Wallace S. N., Carrier D. J. and Clausen E. C. Batch solvent extraction of flavanolignans from milk thistle (*Silybum marianum* L. Gaertner). *Phytochem. Anal.* 2005; 16 (1): 7 - 16.

19. Wallace S. N., Carrier D. J. and Clausen E. Extraction of nutraceuticals from milk thistle: part II. Extraction with organic solvents. *Appl. Biochem. Biotechnol*. 2003; 105 – 108: 891 - 903.

20. Abouzid S. F., Chen S. N., McAlpine J. B., Friesen J. B. and Pauli G. F. *Silybum marianum* pericarp yields enhanced silymarin products. *Fitoterapia* 2016; 112: 136 - 143.

Effect of Different Incoming Feeds, Defatting Procedures and Solvents on Producing of Standard Silymarin Extract

Hajiaghaee R (Ph.D.)[1]*, Rezazadeh Sh (Ph.D.)[1], Ghafarzadegan R (Ph.D. student)[1], Mohamadnejad A (M.Sc.)[1]

1- Medicinal Plants Research Center, Institute of Medicinal Plants, ACECR, Karaj, Iran
*Corresponding author: Medicinal Plants Research Center, Institute of Medicinal Plants, ACECR, 55th Kilometer of Tehran-Qazvin Freeway, Karaj, P.O.Box: 31375-1369, Iran
Tel: +98-26-34764010-19, Fax: +98-26-34764021
E-mail: rhajiaghaee@yahoo.com

Abstract

Background: The medicinal plant milk thistle with the scientific name of *Silybum marianum* is an annual or biennial herb native to the Mediterranean regions and is found through the world. Extracts from the seeds of this plant have been used to cure liver disorders since ancient times. Featured phytochemicals of this medicinal plant are flavonolignan compounds and silybin is the most important one.

Objective: In this study, the effects of applying different incoming feeds, defatting procedures and solvents on silymarin extraction process from the seeds of milk thistle have been investigated.

Methods: Reflux extraction was used to obtain extracts. All extracts have been refluxed for 6 hours and the temperature was fixed at 60°C. Different incoming feeds including ground seeds, solvent defatted meal, cold press defatted meal, and separated pericarps have been subjected to the extraction system. Also, three different solvents including methanol, methanol 80%, and ethanol 80% were employed. Prepared extracts were weighed and then HPLC method analysis was used for quantifying silymarin compounds.

Results: According to the presented data, the concentration and amount of silymarin in different extracts was compared. The extract obtained from ground seeds with methanol was able to reach the most amount of silymarin while the highest concentration of silymarin was obtained from the extract of ground pericarp with ethanol 80%.

Conclusion: This study shows that a higher amount of active ingredient can be extracted by using ground seeds and methanol solvent. Of course, there are more impurities in this extract.

Keywords: Silymarin, Incoming feeds, Milk thistle, Solvent of extraction, Standard extract