مطالعه و تعیین فلاونولیگنان‌ها در میوه‌های گیاه خارمریم جمع‌آوری شده از نقاط مختلف ایران به روش‌های اسپکتروفتومتری، TLC و HPLC

طاهره حسنلو[۱]*، رمضانعلی خاوری‌نژاد[۲]، اسلام مجیدی‌هروان[۳]، سیدعلی ضیایی[٤]، محمدرضا شمس‌اردکانی[٥]

۱- دانشجوی دکتری فیزیولوژی گیاهی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه تربیت معلم، تهران
۲- استاد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه تربیت معلم، تهران
۳- استاد پژوهشی، بخش فیزیولوژی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، تهران
۴- استادیار پژوهش،گروه پژوهشی فارماکولوژی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی، تهران
۵- دانشیار، گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
* آدرس مکاتبه: کرج، ابتدای جاده ماهدشت، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی
تلفن: ۲۷۰۳۵۳۶ (۰۲۶۱)، نمابر: ۲۷۰۴۵۳۹ (۰۲۶۱)
پست الکترونیک: thasanloo@yahoo.com

تاریخ تصویب: ۸۳/۱۱/۵

چکیده

مقدمه: سیلی‌مارین ترکیبی فلاونوییدی متشکل از ۵ نوع فلاونولیگنان مختلف است که در میوه‌های رسیده گیاه خارمریم وجود دارد. این فلاونولیگنان‌ها شامل سیلی‌بین B,A، ایزوسیلی‌بین B,A، سیلی‌دیانین، سیلی‌کریسیتین و تاکسی‌فولین می‌باشند. سیلی‌بین ترکیب اصلی این ماده است. سیلی‌مارین دارای خواص آنتی‌اکسیدانت می‌باشد و به عنوان یک داروی موثر در درمان مسمومیت کبدی شناخته شده است.

هدف: جهت درک بهتر از مسیر متابولیسمی و تاثیر محیط رویش گیاه بر تجمع سیلی‌مارین میوه‌های رسیده این گیاه از نقاط مختلف کشور (شمال، غرب و جنوب غرب)، جمع‌آوری و میزان سیلی‌مارین اندازه‌گیری شد.

روش تحقیق: دانه‌های جمع‌آوری شده از مناطق مختلف ایران و با منشا مجارستان و همچنین دانه‌های حاصل از کشت رقم مجاری در گل‌خانه در محل پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی تهیه شده و مقدار کمی و کیفی ترکیبات فلاونوییدی پس از استخراج به سه روش اسپکتروفتومتری، TLC و HPLC مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: مطابق روش اسپکتروفتومتری بالاترین مقدار تجمع سیلی‌مارین مربوط به منطقه ولشت و سپس برازجان است. با انجام روش TLC و با مقایسه با نمونه‌های استاندارد ۵ لکه مربوط به فلاونولیگنان‌های حاضر در سیلی‌مارین در تمام مناطق شناسایی شد. مقدار کمی این ترکیبات به روش HPLC بررسی شد و نتایج نشان می‌دهد که بالاترین مقدار سیلی‌مارین در دانه‌های مربوط به منطقه برازجان تجمع دارد. در این روش سیلی‌بین A و B، ایزوسیلی‌بین A و B به راحتی از یکدیگر جدا شده و قابل بررسی است.

نتیجه‌گیری: بنابر ضرورت تولید تجاری این گیاه و ثبات فرمولاسیون دارویی آن نیاز به ارزیابی وسیع‌تر و انتخاب ژنوتیپ برتر و خالص‌سازی آن جهت تولید صنعتی می‌باشد.

گل‌واژگان: فلاونولیگنان، سیلی‌بین، سیلی‌مارین، خارمریم

مقدمه

خار مریم[1] گیاهی یک یا دو ساله از خانواده کاسنی، دارای ریشه ضخیم و ساقه‌ای منشعب با ارتفاع ۰/۸ تا۱/۵ متر است. ساقه گیاه کرکی و به رنگ قهوه‌ای کمرنگ می‌باشد. برگ آن براق، دندانه‌دار با رگبرگ‌های سفید با خارهای نوک تیز است. گل دارای کاپیتول‌های درشت منفرد و شامل گل‌های لوله‌ای و ارغوانی رنگ است. میوه فندقه صاف به رنگ قهوه‌ای و در انتهای آن تارهایی به نام پاپوس وجود دارد. میوه‌های آن دارای فلاونولیگنان‌هایی است که به عنوان داروی محافظ کبدی مورد استفاده قرار گرفته است [۱]. این ترکیبات شامل سیلی‌بین[2] (سیلی‌بین A و B، ایزوسیلی‌بین[3] A و B) سیلی‌کریستین[4]، سیلی‌دیانین[5] و تاکسی‌فولین[6] می‌باشند که مجموعاً سیلی‌مارین نامیده می‌شود [۲،۳]. این گیاه در کشورهای امریکایی در مناطق معتدل، استرالیا و مناطقی با آب و هوای مدیترانه‌ای رویش می‌یابد [۴]. خار مریم در نواحی مختلفی از ایران نیز رشد می‌کند.

این ماده سبب تغییر ساختمان سطح غشای سلول‌های کبدی می‌شود و با اثرات ضد اکسیداسیونی به عنوان یک آنتی‌اکسیدانت عمل می‌کند [۳،۵]. در سال ۱۹۷۷ بیکر و همکاران به مطالعه فلاونوییدهای این گیاه پرداخته و موفق به جداسازی و مطالعه این فلاونوییدها شدند [۲]. تایتل و همکاران نیز در ۱۹۷۷ به مطالعه این فلاونوییدها از طریق HPLC پرداختند [۶]. وگنر و همکاران در ۱۹۷۴و ۱۹۶۸ مطالعه و آنالیز سیلی‌مارین در این گیاه را انجام دادند [۷،۸]. در سال‌های اخیر مطالعات زیادی در مورد نحوه عمل داروی سیلی‌مارین در موش و انسان انجام شده است [۹،۱۰].

مطالعات زیادی نشان داده که سیلی‌بین ترکیب اصلی ماده سیلی‌مارین می‌باشد اگر چه سیلی‌دیانین و سیلی‌کریستین نیز دارای خواص آنتی‌اکسیدان هستند [۱۱،۱۲]. نتایج مطالعات نشان می‌دهد که سیلی‌مارین اگر به صورت ترکیبی از سیلی‌بین به همراه ترکیبات سیلی‌دیانین و سیلی‌کریستین باشد نسبت به زمانی‌که به تنهایی مورد استفاده قرار می‌گیرد دارای اثرات بیشتری است [۵،۱۳،۱۴].

گرچه در گذشته متابولیت‌های ثانویه گیاهی را تنها به عنوان ترکیباتی شیمیایی تعریف می‌کردند که در مراحل بیوشیمیایی سلول زنده و ساختار و حفاظت سلول‌های گیاهی وارد نمی‌شود. تحقیقات اخیر نشان داده است که این ترکیبات دارای نقش‌های اساسی در گیاه خصوصاً اکوفیزیولوژی آن هستند [۱۵]. گیاهان قادر هستند به گستره وسیعی از محرک‌های محیطی پاسخ دهند و بسیاری از این پاسخ‌ها مربوط به فعال‌سازی ژن‌های کد کننده پروتئین با اعمال حفاظتی و به ویژه پاسخ ژنی به محرک‌های خاص می‌باشد. امروزه پذیرفته شده است که یک برهم کنش درونی بین گیاهان و محیطشان و متابولیت‌های ثانویه خاص آن گونه وجود دارد که در این برهم کنش دارای نقش‌های کلیدی می‌باشند [۹]. متابولیت‌های ثانویه می‌توانند به عنوان ترکیبات سیگنالی در نمو گیاهی نیز شرکت کنند [۱۶].

در مطالعات تنوع شیمیایی علاوه بر جمع‌آوری و تجزیه و تحلیل توده‌های گیاهی مربوط لااقل ۳ فاکتور عمده را باید بررسی نمود ۱-تنوع ژنتیکی ۲- تنوع آنتوژنتیک و مورفولوژیک ۳- تغییرات حاصل از اثرات محیط. از آنجا که شرایط محیطی محل رویش و نیز نوع گیاه از عواملی هستند که در کیفیت و کمیت ترکیبات ثانویه موجود در گیاهان دارویی تاثیر دارند و با توجه به مصرف دارویی گسترده این گیاه و همچنین فقدان وجود داروی جایگزین با منشای طبیعی در ایران مطالعه بر روی متابولیت‌های ثانویه موجود گیاهان رویش یافته در ایران از اهمیت به سزایی برخوردار می‌باشد [۱۵،۱۷]. به این منظور دانه‌های این گیاه از نواحی مختلف رویش یافته گیاه در ایران جمع‌آوری شدند و با نمونه‌ای که از پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی (رقم مجاری) تهیه ودر گل‌خانه و در محل پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی در کرج کشت شده بود به سه روش اسپکتروفتومتری، TLC و HPLC از نظر مقدار سیلی‌مارین مقایسه شدند.

روش کار

دانه‌های گیاه خارمریم در طی ماه خرداد و تیر از نقاط مختلف ایران (مازندران، لرستان، فارس، خوزستان و بوشهر) که این گیاه به صورت خودرو رویش می‌یابد جمع‌آوری شدند (جدول شماره ۱). بذرهای با منشای مجارستان از پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی تهیه شدند و در گل‌خانه با فتوپریود ۱۸ ساعته و نیز در محوطه در پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی در کرج کشت گردیدند و مقدار سیلی‌مارین آنها به روش زیر استخراج و مورد اندازه‌گیری قرار گرفت.

به منظور استخراج سیلی‌مارین از دانه‌های خشک گیاه خارمریم سه گرم از میوه‌های خشک شده گیاه خار مریم آسیاب شده و جهت روغن‌گیری به مدت ۱۰ ساعت در حلال پترولئوم اتر در سوکسله قرار گرفتند. پس از جداسازی روغن باقی‌مانده نمونه‌ها کاملاً خشک و سپس به مدت ۱۶ ساعت با استفاده از متانول جهت استخراج سیلی‌مارین سوکسله شدند. محلول متانولی حاصل به مدت ۵ ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و پس از تبخیر متانول پودر زرد رنگی حاصل شد. پودر حاصل با متانول به حجم ۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد [۱].

اندازه‌گیری سیلی‌مارین به روش اسپکتروفتومتری

یک میلی‌لیتر از محلول نمونه را به داخل بالن ۱۰ میلی‌لیتر انتقال داده، ۲میلی‌لیتر محلول ۲ و ۴- دی‌نیتروفنیل هیدرازین - سولفوریک

[1] *Silybum marianum* (L.) Gaertn.
[2] Silybin
[3] Isosilybin
[4] Silychristin
[5] Silydianin
[6] Taxifolin

اسید (یک گرم از ماده مزبور در دو میلی‌لیتر سولفوریک اسید حل شده سپس با متانول به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد) به آن اضافه و به مدت ۵۰ دقیقه روی بن ماری ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از سرد شدن بالن حجم آن با افزودن پتاس متانولی ده درصد به ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس یک میلی‌لیتراز این محلول به لوله سانتریفیوژ منتقل و۲۰ میلی‌لیتر متانول به آن اضافه و سانتریفیوژ شد. محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ را به بالن ۵۰ میلی‌لیتری منتقل نموده و با افزودن ۲۰ میلی‌لیتر متانول به لوله سانتریفیوژ دوباره سانتریفیوژ تکرار شد و محلول رویی به بالن ۵۰ میلی‌لیتری منتقل شد. در نهایت محتویات بالن توسط متانول به حجم ۵۰ میلی‌لیتر رسید و جذب نوری محلول در طول موج ۴۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

محاسبه مقدار سیلی‌مارین: میزان سیلی‌مارین با دو روش زیر محاسبه گردید:

۱- روش محاسبه از طریق رسم منحنی رگرسیون با استفاده از رقت‌های محلول سیلی‌بین استاندارد: به این منظور ۲۰ میلی‌گرم سیلی‌بین در بالن ۱۰۰میلی‌لیتری انتقال یافته و با متانول به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس یک سری محلول با رقت‌های مختلف تهیه گردید و جذب محلول‌های رقیق شده پس از افزودن معرف‌های لازم در طول موج ۴۹۰ نانومتر اندازه‌گیری و سپس منحنی رگرسیون رسم شده و مقدار سیلی‌مارین بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن خشک با استفاده از منحنی خطی اندازه‌گیری شد.

۲- روش محاسبه بر مبنای شدت جذب محلول ۱ درصد سیلی‌بین در سل کوارتز ۱ سانتی‌متری (A1 % 1cm=537). محاسبه درصد سیلی‌مارین طبق رابطه ذیل به دست می‌آید:

$$\text{درصد سیلی‌مارین} = A \times ۱۰ \times ۵۰ \times ۵۰ \times ۱۰۰ / A1\%1cm \times ۱۰۰ \times M$$

که در این رابطه A برابر میزان جذب محلول نمونه و M عبارت از وزن نمونه گیاهی می‌باشد [۱۸].

اندازه‌گیری سیلی‌مارین به روش کروماتوگرافی لایه نازک

۱۰ میکرولیتر از نمونه‌های استخراجی و استانداردهای تهیه شده از سیلی‌بین (تهیه شده از شرکت Sigma) با استفاده از روش کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) و با استفاده از صفحات سیلیکاژل HF_{254} و سیستم حلال حاوی کلروفرم، استون، فرمیک اسید به نسبت ۹:۲:۱ تحت کروماتوگرافی قرار گرفتند [۷،۱۱،۱۳]. پس از خشک شدن صفحات سیلیکاژل، هر صفحه توسط KOH متانولی ۵ درصد و محلول ۱ درصد متانولی از NP[1] رنگ‌آمیزی شدند و باندهای ایجاد شده در زیر لامپ UV با طول موج ۳۶۶ نانومتر و با مقایسه با R_f ترکیبات استاندارد شناسایی شدند.

با توجه به نمونه‌های استاندارد سیلی‌بین، سیلی‌کریستین، سیلی‌دیانین، تاکسی‌فولین، نارینجنین (پیش‌ساز) و کوماریلیک اسید (پیش‌ساز) که تحت نورهای با طول موج ۳۶۶ نانومتر پس از رنگ‌آمیزی به ترتیب به رنگ‌های سبز فسفری، سبز، فسفری، خردلی، نارنجی، آبی و سبز نمایان شدند. ۵ باند در تمامی نمونه‌ها تشخیص داده شد که مربوط به سیلی‌بین، ایزوسیلی‌بین، سیلی‌کریستین، سیلی‌دیانین و تاکسی‌فولین بود (جدول شماره ۳) [۱۹].

اندازه‌گیری سیلی‌مارین به روش کروماتوگرافی مایع

جهت بررسی دقیق‌تر و تعیین کمی ترکیبات از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا استفاده شد [۱۹،۲۰،۲۱]. این دستگاه از کارخانه Knauer شامل پمپ K1001، دتکتور UV مدل K2501، اتوسمپلر Marathon و نرم‌افزار Chromgate استفاده شد. ۲۰ میکرولیتر از نمونه‌های قبلی که به نسبت ۱ به ۱۰ رقیق شده بودند به دستگاه تزریق شدند و با فاز متحرک متانول، استونیتریل و آب (مطابق جدول ۴) و با فلوی یک میلی‌لیتر در دقیقه از ستون Nucleosil C_{18} به قطر ذرات 5µ و ابعاد 4.6mm × 150 عبور کرده و در طول موج ۲۸۰ نانومتر شناسایی شدند. کل زمان هر کروماتوگراف ۳۰ دقیقه بود. پیک‌های اجزای فلاوولیگنان‌ها در مقایسه با سیلی‌مارین استاندارد سیگما مشخص شده و مقادیر هر یک بر اساس منحنی استاندارد سیلی‌بین استاندارد محاسبه می‌شود.

برای انجام آزمون‌های آماری از نرم‌افزار SASS استفاده شد. داده‌ها به صورت میانگین ± خطای استاندارد گزارش شده است (جدول شماره ۵). اختلاف آماری میانگین‌ها در طرح بلوک‌های کامل تصادفی با استفاده از آزمون دانکن در سطح خطای ۵ درصد محاسبه گردید.

نتایج

با توجه به به کارگیری دو روش محاسبه نتایج حاصل از اندازه‌گیری سیلی‌مارین به روش اسپکتروفتومتری مشابه یکدیگر بوده و اختلاف آماری معنی‌داری نشان نمی‌دهد. مقایسه میانگین سیلی‌مارین بذور به روش دانکن (جدول شماره ۲) نشان می‌دهد بالاترین میانگین سیلی‌مارین مربوط به منطقه ولشت بوده و پایین‌ترین میانگین مربوط به منطقه ولی‌آباد و کازرون می‌باشد. به طوری‌که میانگین مقدار سیلی‌مارین بر حسب میلی‌گرم بر گرم ماده خشک در دانه‌های جمع‌آوری شده از ناحیه ولشت ۵۳/۴۲ و در منطقه ولی‌آباد در دو ارتفاع متفاوت ۱۰۰ و ۱۸۰۰ متر، به ترتیب ۱۹/۷۲ و ۱۹/۱۸ که تفاوتی از نظر مقدار سیلی‌مارین در دو ارتفاع مختلف دیده نمی‌شود (جدول شماره ۲). درصد سیلی‌مارین تجمع یافته در دانه‌های مربوط به منطقه ولشت نسبت به رقم مجاری حدود دو برابر بوده و از نظر آماری دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشد. دانه‌های گیاهان کشت شده در کرج (رقم مجاری) از نظر درصد سیلی‌مارین تجمع یافته در دانه (۱/۸۰) نسبت به نمونه‌های تهیه شده از این رقم از پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی و بذور کشت شده در گل‌خانه این رقم بالاتر بوده ولی درصد سیلی‌مارین حاصل از نمونه‌های کشت شده در

[1] Natural Product

گل‌خانه و رقم با منشا مجارستان تفاوت چندانی نداشته است. مقدار سیلی‌مارین در مناطق برازجان، بنفشه ده کلاردشت، هزارچم، حسن آباد، رودبارک و خرم‌آباد در مقایسه میانگین‌ها در یک گروه قرار می‌گیرند و این در حالی است که درصد سیلی‌مارین آنها نسبت به مناطق مرزن‌آباد، اهواز، بوشهر، کازرون و ولی‌آباد بالاتر می‌باشد ولی از نظر آماری در یک گروه قرار می‌گیرند.

با انجام روش TLC از عصاره متانولی حاصل از دانه‌های مربوط به هر یک از مناطق ۵ لکه در کلیه نمونه‌ها مشاهده شد. R_f مربوط به لکه‌ها در جدول شماره ۳ ارایه گردیده است. در این روش سیلی‌بین A و B، ایزوسیلی‌بین A و B در طی صفحه سیلیکاژل به طور جداگانه حرکت کرده‌اند.

جهت تعیین مقدار کمی فلاونولیگنان‌های حاضر در عصاره متانولی استخراج شده و بررسی کیفی از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا استفاده شد و با استفاده از روش ارایه شده در این مقاله سیلی‌بین A و B، ایزوسیلی‌بین A و B به راحتی از یکدیگر جدا شده و قابل بررسی می‌گردند.

جدول شماره ۱- مشخصات جغرافیایی مناطق جمع‌آوری میوه‌های رسیده خارمریم

شماره نمونه	محل جمع‌آوری	ارتفاع	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی	حداقل دما (تیر ۱۳۸۲)	حداکثر دما (تیر ۱۳۸۲)	حداقل رطوبت (تیر ۱۳۸۲)	حداکثر رطوبت (تیر ۱۳۸۲)
۱	ولی‌آباد	۱۸۰۰	۵۱° ۱۸′	۳۶° ۱۴′	۲۴	۳۲	۶۱	۸۹
۲	هزارچم	۱۲۶۰	۵۱° ۱۰′	۳۶° ۱۱′				
۳	رودبارک	۱۱۸۰	۵۱° ۷′	۳۶° ۲۹′				
۴	بنفشه‌ده	۱۰۴۰	۵۱° ۱۵′	۳۶° ۳۱′				
۵	ولشت	۸۳۰	۵۱° ۱۸′	۳۶° ۲۳′				
۶	مرزن‌آباد	۴۶۰	۵۱° ۱۸′	۳۶° ۲۷′				
۷	حسن‌آباد	۴۰۰	۵۱° ۲۱′	۳۶° ۲۸′				
۸	ولی‌آباد	۱۰۰	۵۱° ۱۸′	۳۶° ۱۵′				
۹	خرم‌آباد	۱۵۶۰	۴۸° ۲۲′	۳۳° ۲۹′	۱۶	۳۷	۱۰	۴۳
۱۰	اهواز	۱۲۰	۴۸° ۴۰′	۳۱° ۲۰′	۲۵	۳۹	۹	۲۱
۱۱	کازرون		۵۲° ۳۲′	۲۹° ۳۶′	۱۸	۳۶	۱۸	۵۱
۱۲	برازجان	۱۱۰	۵۱° ۱۷′	۲۹° ۲۰′	۲۲	۲۶	۵۲	۷۳
۱۳	بوشهر	۶۰	۵۰° ۵۰′	۲۸° ۵۹′	۲۹	۳۹	۶۱	۹۳
۱۴	گل‌خانه	۱۵۲۰	۵۰° ۵۹′	۳۵° ۵۲′	۲۲	۳۷	۱۰	۵۵
۱۵	کرج	۱۳۱۲	۵۰° ۵۶′	۳۵° ۴۷′	۲۰	۳۰	۶۰	۶۵

نتایج نشان می‌دهد که بالاترین مقدار تجمع سیلی‌مارین در دانه‌های مربوط به منطقه برازجان است (جدول شماره ۵). از نظر آماری تفاوت معنی‌داری با مقدار سیلی‌مارین با منشای مجاری و منطقه کازرون ندارد. ولی نسبت به مناطق خرم‌آباد، اهواز، حسن‌آباد، بوشهر و دانه‌های مجاری که در گل‌خانه کشت شده‌اند، تفاوت معنی‌داری وجود دارد. نکته جالب این است که مقدار سیلی‌مارین در دانه‌های با منشای مجار که در شرایط گل‌خانه و کنترل شده کشت گردیده بودند بسیار پایین بود.

مهمترین فلاونولیگان‌های تجمع یافته در دانه‌های مربوط به منطقه برازجان، سیلی‌بین B,A می‌باشند که دارای نسبت ۷۵ و ۲۵ درصد هستند و با توجه به اهمیت حضور این ترکیب از نظر خواص دارویی و درمانی سیلی‌مارین این نکته حایز اهمیت بسیاری می‌باشد، به‌طوری‌که مقدار سیلی‌بین B,A در منطقه برازجان، کازرون، حسن‌آباد و نمونه مجاری آن تفاوت قابل ملاحظه‌ای با سایر مناطق خصوصاً نمونه‌های مجاری که در گل‌خانه کشت شده‌اند دارد.

بالاترین مقدار سیلی‌بین B در مناطق خرم‌آباد و برازجان دیده می‌شود که باز هم نسبت به نمونه‌های منطقه بوشهر و نمونه‌های مجاری رشده کرده در گل‌خانه تفاوت بسیاری دارد.

حدود ۳۰ درصد از مقدار سیلی‌مارین موجود در میوه‌های منطقه برازجان که برابر با نمونه استاندارد سیلی‌مارین می‌باشد، سیلی‌بین A و B است و در نمونه مجاری مورد بررسی حدود ۲۴ درصد از کل سیلی‌مارین متعلق به سیلی‌بین A و B می‌باشد.

مقدار ایزوسیلی‌بین B در منطقه برازجان بالاترین مقدار را دارا است و تفاوت معنی‌داری با سایر مناطق دارد که حدود ۴ برابر مقدار این ماده در نمونه مجاری می‌باشد. مقدار ایزوسیلی‌بین A بیشتر از ایزوسیلی‌بین B خصوصاً در نمونه رودبارک که ۲ برابر مقدار آن در نمونه مجاری است و تفاوت معنی‌داری بین بیشتر مناطق از نظر مقدار این ترکیب دیده نمی‌شود. مقدار سیلی‌دیانین در دانه‌های مربوط به برازجان (بالاترین مقدار) و نمونه‌های مجار، خرم‌آباد و کازرون نسبت به مقدار این ماده در دانه‌های مناطق اهواز، بوشهر و گل‌خانه تفاوت معنی‌داری دارد. مقدار سیلی‌کریستین در دانه‌های مجاری بالاترین مقدار و در بقیه مناطق تفاوت معنی‌داری وجود ندارد و دانه‌های برازجان و خرم‌آباد فاقد این ماده بودند.

جدول شماره ۲- مقایسه میانگین مقدار سیلی‌مارین در میوه‌های رسیده گیاهان خارمریم جمع‌آوری شده از مناطق مختلف کشور و رقم مجاری شماره ۱٦ به روش اسپکتروفتومتری (آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح خطای ۵ درصد)

شماره نمونه	میانگین (میلی‌گرم بر گرم ماده خشک)	میانگین (درصد)
۵	۵۳/۴۲a	۲/۳۴a
۱۲	۳۹/۱۹ab	۱/۸۹ab
۱۵	۳۶/۷۳ab	۱/۷۲ab
۴	۳۶/۴۶ab	۱/۶۵ab
۲	۳۶/۳۴ab	۱/۶۲ab
۷	۳۵/۱۳ab	۱/۵۷ab
۳	۳۰/۸۱ab	۱/۳۹ab
۹	۳۰/۲۶ab	۱/۳۷ab
۱۶	۲۶/۶۵b	۱/۲۱b
۶	۲۵/۸۴b	۱/۱۹b
۱۴	۲۴/۵۶b	۱/۰۸b
۱۰	۲۲/۴۳b	۱/۰۵b
۱۳	۲۰/۸۳b	۱/۰۴b
۱۱	۲۰/۴۴b	۰/۹۶b
۸	۱۹/۷۲b	۰/۹۳b
۱	۱۹/۱۸b	۰/۹۱b

- حروف یکسان بیانگر عدم وجود اختلاف است.

جدول شماره ۳- R_f فلاونولیگنان‌ها در مطالعه به روشTLC

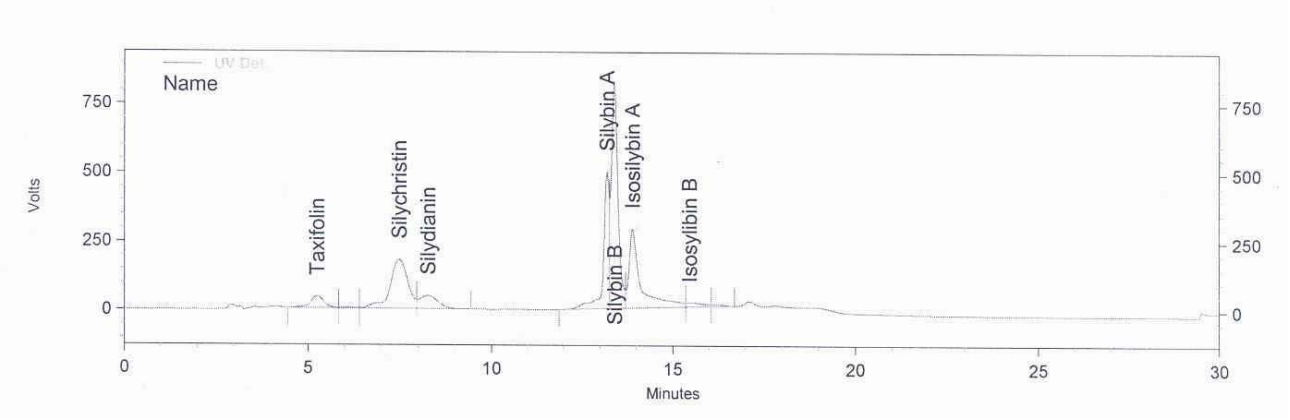
	فلاونولیگنان‌ها						
	تاکسی‌فولین	سیلی‌کریستین	سیلی‌دیانین	سیلی‌بین A	سیلی‌بین B	ایزوسیلی‌بین A	ایزوسیلی‌بین B
R_f	۰/۴۵	۰/۴	۰/۵۵	۰/۶	۰/۶	۰/۶۵	۰/۶۵

جدول شماره ٤- برنامه سیستم حلال‌ها در دستگاه HPLC

زمان (دقیقه)	متانول	استونیتریل	آب (pH= ۲/۳) با H_3PO_4 ۱۰ درصد
۰:۰۰	۲۲	۱۵	۶۳
۷:۳۰	۲۲	۱۵	۶۳
۱۵:۰۰	۴۰	۲۰	۴۰
۳۰:۰۰	۲۲	۱۵	۶۳

جدول شماره ۵- مقدار فلاونولیگنان‌ها (میلی‌گرم بر گرم ماده خشک) در میوه‌های رسیده گیاه خارمریم از نواحی مختلف ایران و نمونه مجاری

نمونه	مقدار فلاونولیگنان‌ها							
	تاکسی‌فولین	سیلی‌کریستین	سیلی‌دیانین	سیلی‌بین A	سیلی‌بین B	ایزوسیلی‌بین A	ایزوسیلی‌بین B	سیلی‌مارین
۱	۰/۴۳۱ ± ۰/۰۹	۰/۳۴۹ ± ۰/۰۲	۰/۳۱۸ ± ۰/۰۱	۱/۶۱۶ ± ۰/۰۷	۳/۲۶۳ ± ۰/۰۱	۲/۷۴۲ ± ۰/۱۱	۰/۰۰۰	۸/۷۲۸ ± ۰/۴۶
۲	۱/۰۹۸ ± ۰/۶۲	۱/۰۱۲ ± ۰/۷۰	۰/۹۶۸ ± ۰/۶۴	۱/۴۳۴ ± ۰/۷۷	۲/۵۶۹ ± ۰/۷۵	۴/۴۸۲ ± ۲/۱۸	۱/۴۱۲ ± ۰/۷۵	۱۲/۶۹۰ ± ۶/۲۲
۳	۳/۰۵۸ ± ۰/۰۸	۳/۵۴۲ ± ۰/۲۴	۶/۰۶۲ ± ۰/۵۴	۰/۱۹۶ ± ۰/۱۱	۱/۱۸۴ ± ۰/۱۸	۷/۱۱۴ ± ۰/۵۱	۳/۴۱۵ ± ۰/۲۵	۲۴/۵۷۳ ± ۱/۷۵
۴	۰/۷۳۱ ± ۰/۰۴	۰/۵۷۷ ± ۰/۰۱	۰/۸۴۹ ± ۰/۲۱	۳/۱۳۴ ± ۰/۰۷	۴/۶۸۵ ± ۰/۰۵	۴/۱۶۸ ± ۰/۴۳	۰/۳۴۱ ± ۰/۳۴	۱۲/۶۹۰ ± ۰/۳۶
۵	۰/۸۴۶ ± ۰/۱۲	۰/۷۳۳ ± ۰/۲۶	۰/۹۹۴ ± ۰/۵۱	۱/۳۱۹ ± ۰/۳۴	۲/۱۶۹ ± ۰/۵۲	۲/۷۴۵ ± ۰/۱۱	۰/۹۴۱ ± ۰/۳۱	۱۴/۴۸۸ ± ۰/۶۵
۶	۰/۷۸۳ ± ۰/۰۴	۰/۴۹۰ ± ۰/۰۱	۰/۵۹۱ ± ۰/۰۳	۱/۰۳۴ ± ۰/۰۶	۱/۴۲۱ ± ۰/۰۹	۴/۰۶۱ ± ۰/۱۹	۰/۰۰۰	۹/۷۴۸ ± ۰/۴۴
۷	۰/۷۳۹ ± ۰/۰۱	۰/۴۶۵ ± ۰/۰۱	۰/۵۳۲ ± ۰/۰۳	۱/۴۳۴ ± ۰/۴۹	۳/۹۳۵ ± ۰/۴۰	۴/۱۴۰ ± ۰/۲۲	۰/۰۰۰	۸/۳۸۴ ± ۰/۷۴
۸	۰/۶۲۸ ± ۰/۰۲	۰/۴۳۲ ± ۰/۰۳	۰/۳۹۱ ± ۰/۰۲	۰/۶۲۱ ± ۰/۳۱	۱/۴۷۹± ۰/۲۸	۲/۱۷۸ ± ۰/۰۸	۱/۱۹۷ ± ۰/۰۶	۶/۹۲۹ ± ۰/۲۵
۹	۱/۶۸۴ ± ۰/۲۵	۰/۰۰۰	۴/۵۴۴ ± ۰/۶۸	۰/۰۰۰	۷/۶۵۶ ± ۱/۱۸	۳/۰۱۱ ± ۰/۵۲	۰/۳۳۹ ± ۰/۱۹	۱۷/۲۳۶ ± ۲/۵۱
۱۰	۲/۳۷۹ ± ۰/۲۵	۲/۲۴۶ ± ۰/۷۰	۲/۴۴۷ ± ۰/۲۹	۰/۸۸۱ ± ۰/۱۶	۲/۴۹۸ ± ۰/۵۱	۲/۴۳۶ ± ۱/۸۰	۳/۳۴۱ ± ۱/۲۱	۱۶/۲۳۰ ± ۱/۳۴
۱۱	۲/۲۲۷ ± ۰/۲۶	۰/۳۸۰ ± ۰/۳۸	۴/۰۹۳ ± ۰/۲۳	۱/۴۴۷ ± ۰/۳۰	۳/۹۰۵ ± ۰/۷۴	۲/۰۸۲ ± ۱/۲۶	۳/۸۱۱ ± ۰/۷۰	۱۷/۹۴۷ ± ۱/۲۷
۱۲	۲/۵۱۳ ± ۰/۰۱	۰/۰۰۰	۵/۷۷۶ ± ۰/۰۱	۲/۳۴۹ ± ۰/۰۲	۶/۴۰۱ ± ۰/۰۱	۱/۴۴۳ ± ۰/۰۱	۸/۶۱۹ ± ۰/۰۳	۲۷/۱۰۲ ± ۰/۰۱
۱۳	۱/۴۰۷ ± ۰/۰۱	۰/۸۲۵ ± ۰/۰۱	۲/۲۵۸ ± ۰/۰۱	۰/۰۰۰	۰/۶۵۴ ± ۰/۰۱	۲/۷۲۱ ± ۰/۰۱	۱/۲۵۶ ± ۰/۰۱	۹/۱۲۴ ± ۰/۰۱
۱۴	۱/۷۷۸ ± ۰/۳۸	۰/۸۵۰ ± ۰/۳۱	۲/۸۷۱ ± ۰/۵۰	۰/۰۰۰	۱/۹۶۸ ± ۱/۱۳	۳/۷۵۱ ± ۲/۱۶	۰/۰۰۰	۱۱/۲۱۹ ± ۳/۹۱
۱۵	۰/۳۴۸ ± ۰/۰۸	۰/۳۸۷ ± ۰/۱۰	۰/۵۹۳ ± ۰/۱۱	۰/۰۰۰	۰/۳۹۴ ± ۰/۱۰	۱/۰۸۳ ± ۰/۲۱	۰/۴۹۱ ± ۰/۰۷	۳/۲۹۰ ± ۰/۶۹
۱۶	۲/۵۱۷ ± ۰/۰۰	۳/۱۶۶ ± ۰/۰۰	۴/۶۷۳ ± ۰/۰۱	۱/۲۴۲ ± ۰/۰۱	۴/۴۹۴ ± ۰/۰۱	۳/۸۹۲ ± ۰/۰۵	۲/۷۵۹ ± ۰/۰۲	۲۲/۷۳۳ ± ۰/۰۱



شکل شماره ۱- کروماتوگرام HPLC عصاره متانولی از میوه‌های رسیده خارمریم

تاکسی‌فولین در دانه‌های مناطق برازجان، اهواز، کازرون و مجار بالاتر از سایر مناطق و نمونه‌های گل‌خانه کمترین میزان این ماده را دارا بودند. بالا بودن مقدار تاکسی‌فولین به عنوان پیش‌ساز سیلی‌بین در نمونه‌های برازجان و رودبارک که بالاترین مقدار سیلی‌مارین را داشتند و همچنین در نمونه‌های اهواز و کازرون که دارای مقدار کمی از این ماده هستند قابل توجه است.

بحث

گیاهان به محرک‌های محیطی پاسخ می‌دهند و متابولیت‌های ثانویه دارای نقش‌های کلیدی در برهم کنش بین گیاه و محیط‌شان هستند و مطابق نتایج بسیاری از محققان فلاونوییدها نیز از جمله متابولیت‌های ثانویه‌ای هستند که مسیر بیوسنتزی آنها تحت تاثیر شرایطی محیطی قرار می‌گیرد و در مراحل نموی و شرایط محیطی دارای نوسان هستند [۱۶،۵].

طبق مشاهدات و مقایسات حاصل از این تحقیق به نظر می‌رسد شرایط محیطی در تغییرات فلاونولیگنان‌های موجود در دانه‌های جمع‌آوری شده از مناطق مختلف تاثیر گذاشته باشد. در مقایسه بین نمونه‌های رشد کرده در گل‌خانه و فضای آزاد کرج با وجود یکسانی ژنوتیپ، شرایط محیطی متفاوت در مقدار سیلی‌مارین تاثیرگذار بوده است.

ضمناً چالکون سنتاز آنزیمی است که در مرحله اتصال ۳ واحد استیل از مالونیل کوانزیم A با ۴ هیدروکسی‌سیتامیل کوانزیم A برای تولید نارینجنین به عنوان پیش‌ساز تولید تاکسی‌فولین در مسیر بیوسنتز سیلی‌بین نقش دارد. این آنزیم یک نقطه کلیدی در کنترل متابولیکی این مسیر بیوسنتزی است. سطح آنزیمی و mRNA چالکون‌سنتتاز در طی مراحل نموی با نوع سلول و در پاسخ به محرک‌های محیطی تغییر می‌کنند و موجبات تغییرات سطوح ترکیبات نهایی در مسیر بیوسنتزی را فراهم می‌آورند [۲۱،۲۲].

استفاده از روش اسپکتروفتومتری در بررسی‌های کلی مقدار سیلی‌مارین مفید می‌باشد و با توجه به اهمیت تعیین درصد ترکیبات فلاونوییدی مختلف حاضر در سیلی‌مارین موجود در میوه‌ها، استفاده از روش‌های دقیق‌تر مثل HPLC توصیه می‌شود.

با توجه به نتایج به دست آمده و عدم اطلاع از مقدار وابستگی و سطح کنترل مقدار ترکیبات به وسیله عوامل ژنتیکی مطالعه براساس مارکری مولکولی و نیز براساس سطوح آنزیمی حاضر در نقاط کلیدی این مسیر بیوسنتزی حایز اهمیت است و به فهم کامل‌تر این مسیر و نقاط کلیدی در کنترل این مسیر بیوسنتزی کمک شایانی خواهد کرد [۲۰].

باید توجه داشت که نسبت ترکیبات حاضر در سیلی‌مارین استخراج شده که در صنایع داروسازی استفاده خواهد شد دارای اهمیت است و مقدار تجمع این ترکیب در عصاره استخراجی از جنبه اقتصادی در چرخهٔ تولید تاثیرگذار می‌باشد. بنابراین با ارزیابی وسیع‌تر و شناخت بیشتر منابع طبیعی این ثروت ملی و خالص‌سازی این نمونه‌ها می‌توان در آینده منابعی با کیفیت بالاتر معرفی کرد.

منابع

1. Alikaridis F, papadakis D, Pantelia K.and Kephalas T. Flavonolignan production from *Silybum marianum* transformed and untransformed root. *culture*. 2000; 71: 379-384.

2. Baker H. Schrall R. Tissue and Suspension Culture of *Silybum marianum*.l. Communication: isolation and growth of tissue and suspension cultures and studies on flavonoids (authors transl). *Planta Med.* 1977; 131: 185-92.

3. Szentmihalyi K, Kery A, Lakatos B, Sandor Z, Petri G. Determination of 23 elements in milke thistle. *Acta. Pharm. Hung.* 1998; 68: 157-62.

4. Cacho M, Moran M, Corchete P, Fernandez-Tarrago J. Influence of medium composition on the accumulation of flavonolignans in cultured cells of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. *Plant Science* 1999; 144: 63-68.

5. Schnfeld JV, Weisbrod B, Muller MK. Silibinin, aplant extract with antioxidant and membrane stabilizing properties, protects exocrine pancreas from cyclosporine A toxicity. *Cellular and Molecular Life Sciences* 1997; 53: 917-920.

6. Titel G, Wagner H. High- performance liquid chromatographic seperation of silymarins and their determination in a raw extract of silybum marianum. *J. Chromatogr.* 1977; 135: 499-501.

7. Wagner H, Diesel P, Seites M. The chemistry and analysis of silymarin from *Silybum marianum*, *Arzheimittle forschung*. 1974; 24: 466-71.

8. Wagner H, Horhammer L, Seitz M. Chemical evaluation of a silymarin-contaning flavonoid conce ntrate from *Silybum marianum. Arzheimittel forschung* 1968; 18: 696-8.

9. Valenzuela A. Biochemical bases of the

pharmacological action of the flavonoid silymarin and of its structural isomer silibinin. *Biol. Res.* 1994; 27: 105-12.

10. Chlopclkova S, Psotova J, Miketova P. Chemoprotective effect of plant phenolics against anthracycline-induced toxicity on rat cardiomyocytes.part I.Silymarin and its flavonolignans. *Phytoter. Res.* 2004; 18: 107-110.

11. Bourgand F, Gravot A, Milesi S and Gontier E. Production of Plant Secondary Metabolites: a historical perspective. *plant science* 2001; 161: 839-851.

12. Hadolin M, Skerget M, Knez Z, Bauman D. High pressure extraction of vitamin E-rich oil from *Silybum marianum. Food chemistry*. 2001; 74: 355-364.

13. Krecman V, Skottova N, Waterova D, Ultichova J,Simanek V. Silymarin inhibits the development of diet-induced hypercholes-terolemia in rats. *Planta media*. 1998; 64: 138-142.

14. Lee DY, Liu Y. Molecular structure and stereochemistry of silybin A, silybin B, isosilybin A, isosilybinB, isolated from *Silybum marianum J. Nat. Prod.* 2003; 66: 1171-1174.

15. Briskin DP. Medicinal Plants and Phytomedicines. Linking Plant Biochemistry and Physiology to Human Health. *Plant Physiology* 2000; 124: 507-514.

16. Kutchan TM. Echological arsenal and developmental dispatcher. The paradigm of secondary metabolism. *Plant physiology* 2001; 125: 58-60.

17. Brenda WS. Flavonoid Biosynthesis: A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology. *Plant Physiology* 2000; 126: 485-493.

۱۸. قاسمی دهکردی نصرالله، طالب امیر مهدی. *استخراج، شناسایی و تعیین مقدار ترکیبات موجود در گیاهان دارویی شاخص*. انتشارات چوگان. ۱۳۸۰، صفحات ۱۳۷-۱۳۲.

19. Gunaratna C, Zhang T. Application of liquid chromatography – electrospray ionization-ion trap mass spectrometry to investigate the metabolism of silibin in human liver microsomes. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 2003; 794: 303-310.

20. Quercia V, Pierini N, Incarnato G P, Papetti P, Gambero P. HPLC evaluation of the ratio between the antihepatotoxic constituents of *Silybum marianum*. Fitoterapia. 1980; 51:297-301.

21. Schmid J, Doerner PW, Clouse SD, Dixon RA, Lamb CJ. Developmental and environmental regulation of a bean chalcone synthase promoter in transgenic tobacco. *The plant cell* 1990; 2: 619-631.

22. Narayana KR, Sripal R, Chaluvadi MR, Krishan DR. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian journal of pharmacology* 2001; 33:2-6.