بررسی اثر حلال‌های مختلف در استخراج سیلی‌مارین از بذر گیاه خارمریم

سیدعلی ضیایی[۱]*، حسن فلاح حسینی[۱]، طیبه رجبیان[۲]، لیلا پورحسینی[۳]، حسنعلی نقدی‌بادی[۴]، شمسعلی رضازاده[۵]

۱- استادیار پژوهش،گروه پژوهشی فارماکولوژی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی، تهران
۲- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران
۳- کارشناس، گروه پژوهشی فارماکولوژی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی، تهران
۴- مربی پژوهش، گروه کشت و توسعه پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی و دانشجوی دکتری رشته زراعت دانشگاه تربیت مدرس، تهران
۵- دستیار تخصصی شیمی دارویی، گروه فارماکوگنوزی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی، تهران
*آدرس مکاتبه: تهران، خیابان انقلاب اسلامی، خیابان قدس، خیابان بزرگمهر غربی، پلاک ۹۷، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی، صندوق پستی: ۱۴۴۶- ۱۳۱۴۵، تلفن: ۶۴۶۲۱۷۹ (۰۲۱)، نمابر: ۶۴۶۵۵۵۴ (۰۲۱)
پست الکترونیک: SAZiai@gmail.com

تاریخ تصویب: ۸۳/۷/۱۳

چکیده

مقدمه: پودر عصارهٔ بذر گیاه خارمریم که به سیلی‌مارین معروف است از گیاهی با نام علمی *Silybum marianum* (L.) Gaertn. استخراج می‌شود. این گیاه در درمان سیروز کبدی دیابت شیرین، هایپرکلسترولمی مصرف دارد. روش‌های متعددی برای استخراج سیلی‌مارین پیشنهاد شده و به خاطر اهمیت پودر سیلی‌مارین بهترین روش استخراج در انحصار است.

هدف: در این مطالعه سعی شده تا اثر حلال‌های مختلف و راندمان هر کدام در تولید سیلی‌مارین بررسی گردد.

روش تحقیق: ۱۰ گرم بذر گیاه خارمریم سه نمونه مرزن‌آباد، گلشن و کشت شده کاملاً پودر شده و با اترودوپترول چربی‌زدایی شد. باقی‌مانده بعد از خشک شدن با یکی از حلال‌های متانول، اتانول، استونیتریل، استن و اتیل‌استات عصاره‌گیری گردید. میزان ترکیبات سیلی‌مارین به وسیلهٔ HPLC اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: نتایج بررسی نشان داد که بیشترین راندمان تولید پودر سیلی‌مارین به ترتیب با متانول، استن، استونیتریل و اتانول است و با توجه به اینکه متانول بیشترین میزان استخراج تمامی اجزای سیلی‌مارین را نسبت به بقیه داشت به عنوان معیار درصد اجزا قرار گرفت و با مقایسه با آن مشخص شد که استن و استونیتریل ترکیب بهترین حلال‌ها برای استخراج سیلیبین هستند.

نتیجه‌گیری: متانول بیشترین اثر را در استخراج دارد و به ترتیب بعد از آن استن و استونیتریل بهترین حلال‌ها هستند.

گل‌واژگان: سیلی‌مارین، سیلی‌بین، فلاوولیگنان‌ها، استخراج، حلال

مقدمه

مطالعات اپیدمیولوژی در سال‌های اخیر مشخص ساخته که مصرف آنتی‌اکسیدان‌ها ریسک ابتلا به بیماری‌های قلبی – عروقی و سرطان‌ها را کاهش می‌دهد. در میان آنتی‌اکسیدان‌های شناخته شده (کارتنوییدها، توکوفرول‌ها، ویتامین C و ویتامین E) خانواده‌ای از ترکیبات شیمیایی کاملاً متفاوت با نام عمومی پلی‌فنل‌ها وجود دارد. سیلی‌مارین ماده‌ای پلی‌فنلی و دارای خاصیت ضدسمیت کبدی است که از گیاه خارمریم با نام علمی *Silybum marianum* (L.) Gaertn. به دست می‌آید. این گیاه به طور خودرو در کنار جاده‌های متروک اراضی بایر در مناطق شمال غرب و جنوب ایران یافت می‌شود [۱،۲]. برگ‌های این گیاه بزرگ با کناره‌های دندانه‌ای و خاردار به رنگ سبز شفاف و گل‌های آن لوله‌ای و به رنگ ارغوانی است. ریشه و اندام هوایی آن طعم تلخ و اثر اشتهاآور داشته و در طب سنتی در درمان انواع بیماری‌ها استفاده می‌شود [۱،۲]. مطالعات اخیر نشان داده که این ماده دارای خواصی چون اثرات درمان کبد چرب، سیروز کبدی، ضددیابت، ضدچربی خون، ضدآب مروارید، ضدپوکی استخوان و ضدسرطان می‌باشد [۳،۴،۵،۶،۷،۸،۹،۱۰]. در مطالعه‌ای که میزان خاصیت آنتی‌اکسیدانی تعدادی از ترکیبات شناخته شده آزمایش می‌گردید، سیلی‌مارین از نظر قدرت در جایگاه نخست این ترکیبات بود [۱۱]. مشتقات این گیاه حدود ۲۰۰ سال است که استفاده می‌شود. این فرآورده از سال ۱۹۶۹ در اروپا مصرف بالینی وسیعی پیدا کرد [۱۲]. سیلی‌مارین از فلاوولیگنان‌های زیر تشکیل یافته است: ۱- سیلی‌کریستین ۲- سیلی‌دیانین ۳- سیلی‌بین A و B ۴- ایزوسیلی‌بین A و B که جزء مهمترین آنها و فراوان ترین آنها می‌باشند.

مهمترین فرآورده‌های دارویی این گیاه در خارج از کشور به صور قرص، کپسول، کرم، محلول و پودر می‌باشد. این گیاه در ایران نیز در درمان مشکلات کبدی استفاده می‌شود اما یکی از عللی که باعث شده تا عصارهٔ این گیاه در ایران به کار نرود مشکلات استخراج آن است. در آخرین نسخه فارماکوپه آمریکا (USP 26) روش اندازه‌گیری سیلی‌مارین به طریقهٔ اسپکتروفتومتری حذف گردیده و روش HPLC جایگزین آن شده است. در این تحقیق سعی شده با روش و معیارهای USP 26 میزان فلاوولیگنان‌های پودر عصارهٔ بذر سیلی‌مارین به دست آمده با استفاده از حلال‌های مختلف محاسبه و مقایسه گردد.

مواد و روش‌ها

۱- مواد

الف- بذر گیاه خار مریم:

الف-۱- بذور بومی که در ۳۰ و ۳۱ اردیبهشت ۱۳۸۳ به ترتیب از مناطق گلشن واقع در ۱۲ کیلومتری جاده خشکبیجار به زیباکنار گیلان و در جاده چالوس ۴ کیلومتری مرزن آباد جمع‌آوری گردید.

الف-۲- بذر کشت شده با استفاده از بذر وارد شده از مجارستان با کد S250 از موسسه Hortus Botanicus Instuti Plantarum Medicinalum که در بانک ژن گروه کشت و توسعه پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی نگهداری می‌شد و در مزرعهٔ تحقیقاتی گروه مذکور کشت گردید.

ب- سیلی‌بین و سیلی‌مارین استاندارد از شرکت سیگما و حلال‌ها با درجهٔ آنالیز از شرکت مرک تهیه گردیدند.

۲- روش‌ها

الف- عصاره‌گیری از بذر گیاه خار مریم: ابتدا بذرهای گیاه خارمریم بومی و کشت شده به مدت ۲۴ ساعت در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس با آسیاب به صورت کامل پودر گردید و پودر حاصل از الک با مش ۴۵ عبور داده شد. ۱۰ گرم از پودر حاصل درون انگشتی ریخته و در سوکسله با اتردوپترول به مدت ۱۲ ساعت روغن‌گیری شد. سپس، پودرهای فاقد چربی به مدت ۳۰ دقیقه به وسیله استونیتریل متانول، استون، اتانول و اتیل‌استات در حمام اولتراسوند عصاره‌گیری شدند. عصاره‌های به دست آمده در خلا تغلیظ و خشک گردیدند. عصاره حاصل در ۱۰ میلی‌لیتر متانول HPLC حل شد و مستقیماً به دستگاه HPLC تزریق گردید.

ب- اندازه‌گیری فلاوولیگنان‌ها: برای اندازه‌گیری فلاوولیگنان‌ها از روش USP 26 استفاده گردید که به طور خلاصه به این شرح است:

۱- منحنی استاندارد سیلی‌بین: غلظت‌های ۰/۵، ۰/۲، ۰/۰۲ و ۰/۰۱۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از سیلی‌بین استاندارد در متانول تهیه و به دستگاه HPLC تزریق گردید و منحنی استاندارد با رسم مجموع سطوح زیر منحنی ۲ پیک سیلی‌بین A و B در برابر غلظت سیلی‌بین استاندارد به دست آمد (شکل شماره ۱).

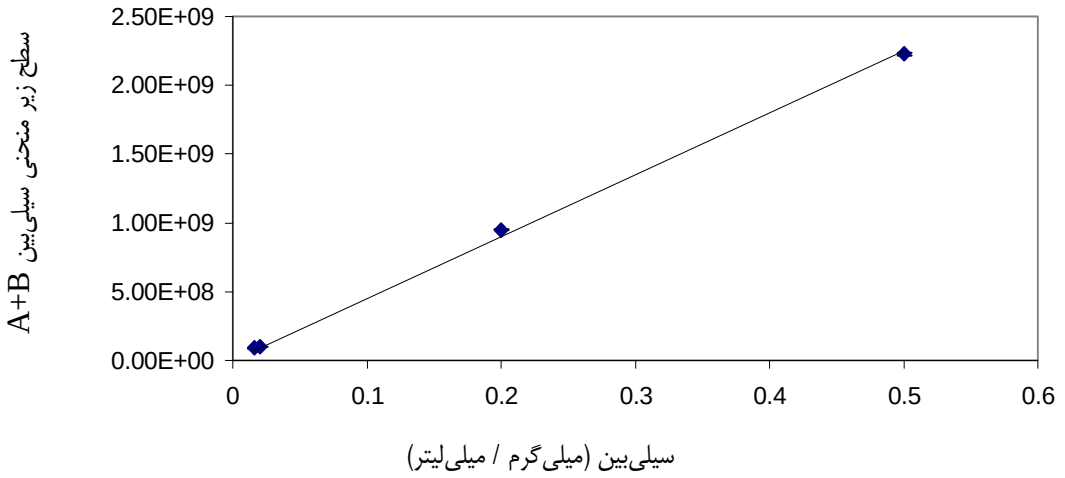
۲- محلول سیلی‌مارین استاندارد: محلولی با غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر پودر سیلی‌مارین استاندارد در متانول تهیه گردید.

۳- شرایط HPLC: ۲۰ میکرولیتر از محلول‌های آزمایش و سیلی‌مارین استاندارد به دستگاه HPLC با مشخصات زیر تزریق گردید.

٤- الف- فاز متحرک: با استفاده از سیستم گرادیان و مطابق جدول شماره ۱ در فلوی ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه جداسازی صورت گرفت.

نمونه‌ها پس از عبور از ستون Nucleosil C_{18} 5μ (150 × 4.6 mm) در طول موج ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد، مشخصات دستگاه HPLC شرکت Knauer عبارت است از: پمپ مدل K 1001، دتکتور UV مدل K 2501 و نرم افزار Chromgate جهت انتگراسیون پیک‌ها.

۵- روش محاسبه میزان فلاوولیگنان‌ها: با استفاده از دستورالعمل USP26 به طور خلاصه به شرح زیر عمل می‌شود: با تزریق استاندارد سیلی‌مارین سیگما به دستگاه HPLC مکان پیک‌های سیلی‌کریستین، سیلی‌دیانین، سیلی‌بین A، سیلی‌بین B، ایزوسیلی‌بین A و ایزوسیلی‌بین B را معین کرده (شکل شماره ۲) و سطح زیر منحنی این پیک‌ها را در نمونه‌های مورد آزمایش اندازه می‌گیریم. با



شکل شماره ۱- منحنی استاندارد مجموع ۲ سطوح زیر منحنی پیک سیلی‌بین A & B در برابر غلظت سیلی‌بین استاندارد

جدول شماره ۱- گرادیان حلال HPLC

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

رسم منحنی کالیبراسیون مجموع دو پیک سیلی‌بین A و B در مقابل غلظت سیلی‌بین استاندارد محلول‌های استاندارد معادلهٔ خط رگرسیون را به دست می‌آوریم. درصد هر جزء از فلاوولیگنان‌های نمونه‌های آزمایش بر حسب میزان سیلی‌بین با استفاده از منحنی کالیبراسیون محاسبه می‌شود. میزان سیلی‌مارین تام برابر است با مجموع مقادیر هر یک از اجزا.

نتایج

- رسم منحنی کالیبراسیون: منحنی کالیبراسیون سیلی بین استاندارد در شکل شماره ۱ نشان داده شده است. معادلهٔ خط رگرسیون عبارت است از:

$$Y= 4495289907/53X$$

- میزان اجزای سیلی‌مارین در سه نمونه مرزن‌آباد، خشکبیجار و کشت شده به ترتیب در شکل‌های ۳ تا ۵ نشان داده شده است.

مقایسه اثر حلال‌ها نشان می‌دهد که متانول قوی‌ترین حلال در استخراج هم سیلی‌مارین و هم اجزای آن بوده و آن را به عنوان استاندارد طلایی جهت مقایسهٔ سایر حلال‌ها انتخاب می‌کنیم. همان‌طور که ملاحظه می‌شود نمونه مرزن‌آباد دارای بیشترین مقدار سیلی‌مارین است و از نظر میزان سیلی‌بین نمونه مرزن‌آباد بیشترین و نمونه گلشن کمترین میزان را دارد.

بحث و نتیجه‌گیری

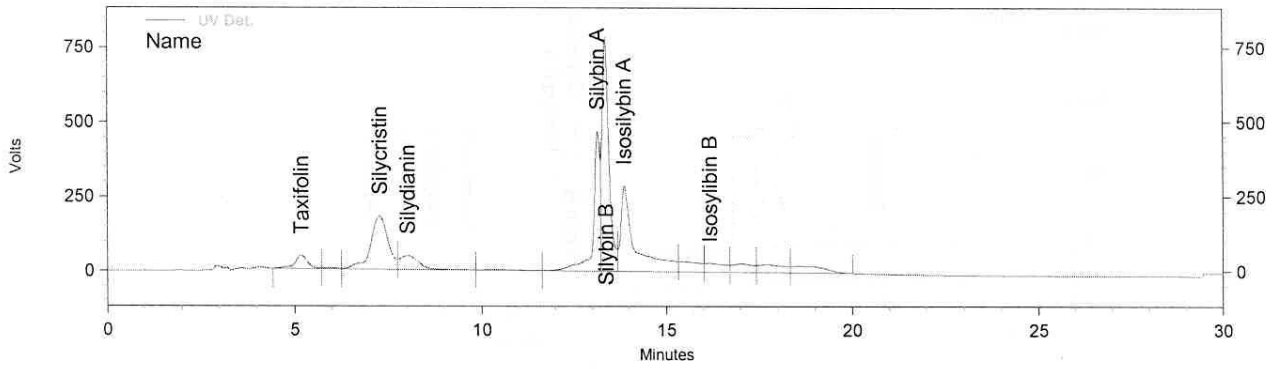
فرآورده‌های گیاهان دارویی از جمله خارمریم از دیرباز توسط اطبای سنتی جهت درمان بیماری‌های کبدی به کار برده شده است. اخیراً تحقیقات گسترده‌ای درخصوص درمان و کاهش چربی خون توسط داروهای گیاهی مخصوصاً خارمریم در کشورهای اروپایی دنبال می‌شود. گیاه Milk thistle با نام علمی *Silybum marianum* (L.) Gaertn. در عربی عکوب و در فارسی به نام خار مریم معروف است. در سال‌های اخیر توجه محققان کشورهای غربی به این گیاه جلب و مقالات متعددی حاکی از موثر بودن آن در درمان بیماری‌های کبدی منتشر شده است. به علاوه از محاسن فرآورده‌های این گیاه آن است که هیچ‌گونه اثر سمی نداشته و می‌توان به طور مداوم آن را مصرف نمود.

محققان آلمانی در سال ۱۹۶۸ سه ماده موثر که به مجموع آنها سیلی‌مارین (Silymarin) گفته می‌شود از میوه، دانه و برگ گیاه خارمریم استخراج نمودند [۱۳].

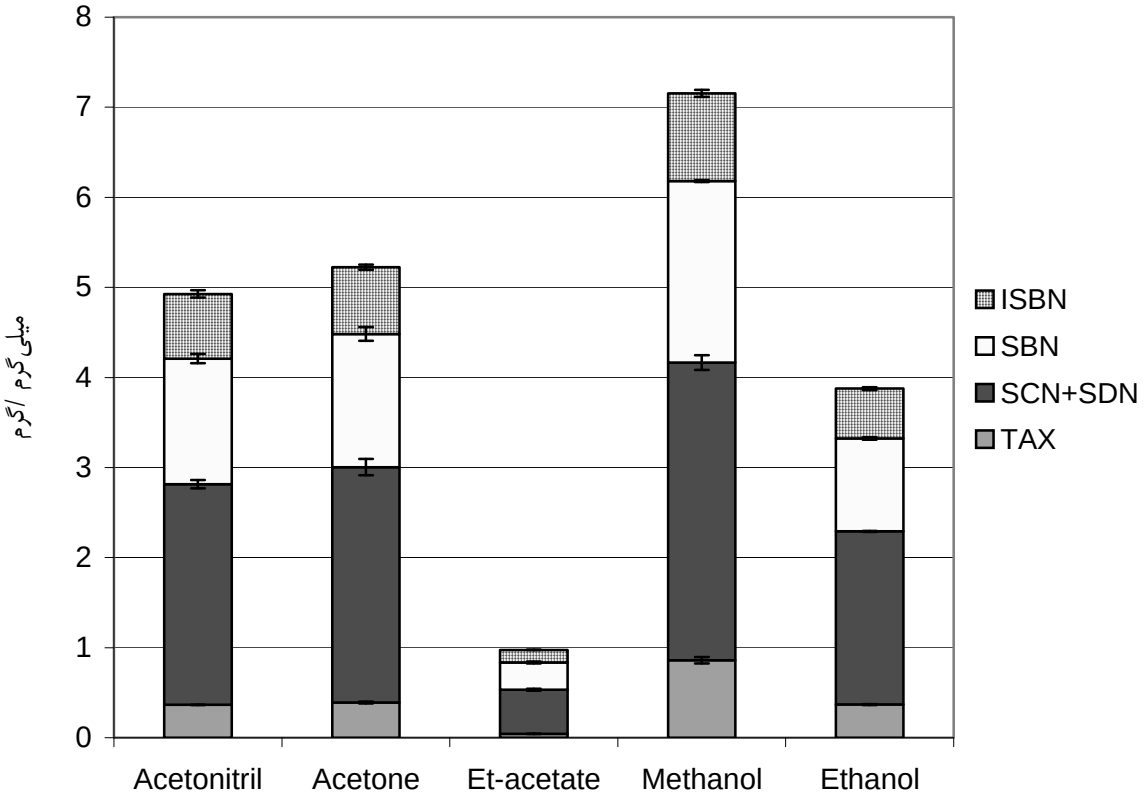
تحقیقات انجام شده در گذشته نشان داده بود که میزان سیلی‌مارین موجود در نمونه‌های ایرانی نسبت به نمونه‌های خارجی

اندک است [۱۴]. در این مطالعه با استفاده از HPLC میزان فلاوولیگنان‌ها بر اساس پودر سیلی‌مارین استاندارد اندازه‌گیری شد و مشاهده گردید که حلال‌های مختلف دارای قدرت‌های متفاوتی در استخراج این ماده بوده و توانایی متانول در استخراج سیلی‌مارین از همهٔ آنها بیشتر است.

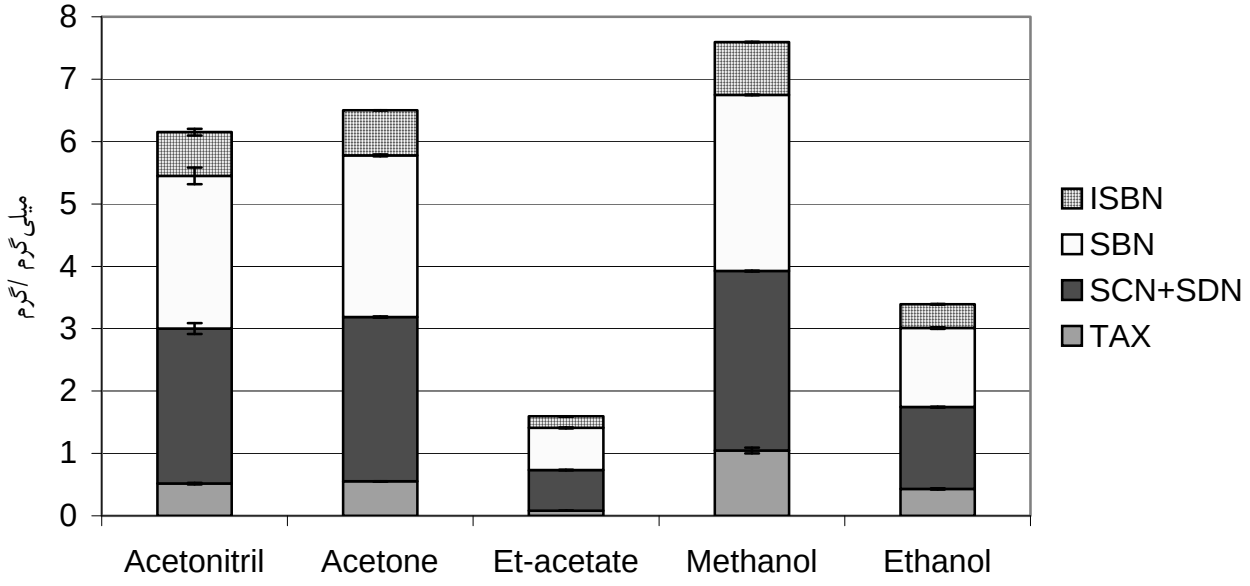
تولید پودر سیلی‌مارین با استفاده از حلال مناسب که کمترین سمیت و بیشترین بازده را داشته باشد مورد توجه بسیار است. در این تحقیق مشخص شد که بعد از متانول، استن و استونیتریل بهترین حلال‌ها جهت استخراج سیلی‌مارین هستند و در استخراج سیلی‌بین و



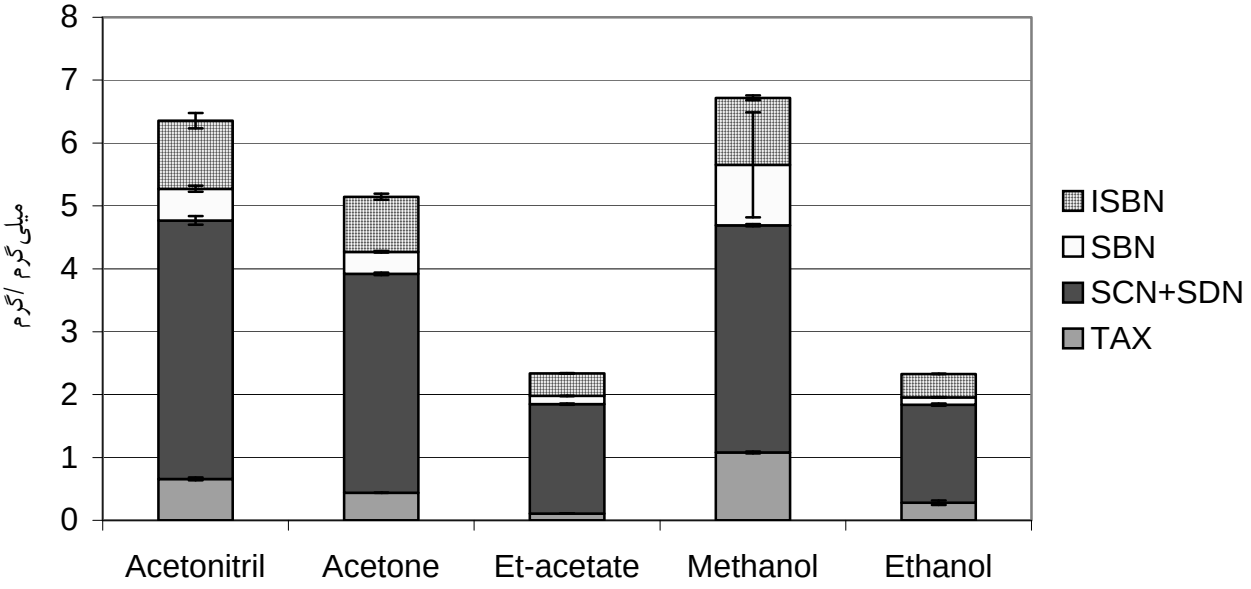
شکل شماره ۲- کروماتوگرام پودر سیلی‌مارین نمونه استاندارد



شکل شماره ۳ – نمونه کشت شده (هر کدام از جعبه‌ها نشانگر یکی از فلاوولیگنان‌ها است و هر ستون نمایندهٔ میزان سیلی‌مارین استخراج شده است)



شکل شماره ٤- نمونه مرزن‌آباد (هر کدام از جعبه‌ها نشانگر یکی از فلاوولیگنان‌ها است و هر ستون نمایندهٔ میزان سیلی‌مارین استخراج شده است)



شکل شماره ٥- نمونه گلشن (هر کدام از جعبه‌ها نشانگر یکی از فلاوولیگنان‌ها است و هر ستون نمایندهٔ میزان سیلی‌مارین استخراج شده است)

ایزوسیلی‌بین قدرت انتخابی بیشتری دارند. استونیتریل در استخراج تاکسی‌فولین از استن قوی‌تر عمل می‌کند، اما در این میان اتیل‌استات دارای کمترین بازده بوده و اتانول که از آن می‌توان به عنوان حلالی بی‌خطر یاد کرد دارای بازده‌ای حدود نصف بازده متانول است. در سالیان اخیر حتی اثر آب جوش در استخراج سیلی‌مارین بررسی شده است که این تمایل حاصل دو عامل بی‌خطری و ارزان‌بودن حلال آب است. ولی اگر بی‌خطری را مهمترین عامل در نظر بگیریم می‌توان گفت که اتانول بهترین حلال در استخراج است. لازم به ذکر است که در این آزمایش کلیه استخراج‌ها در یک زمان واحد اندک صورت گرفته و این نتایج بیشتر بیانگر قدرت و سرعت استخراج حلال‌ها است شاید اتانول بتواند در مدت زمان بیشتری همان بازده متانول را ایجاد نماید و شاهد این ادعا تولید پودر سیلی‌مارین با اتانول در کارخانه‌های چین است. در خاتمه از آنجایی‌که تولید پودر سیلی‌مارین یک امر استراتژیک و صنعتی است، اطلاعات اندکی در مورد روش‌های استخراج وجود دارد که برای تولیدکنندگان داخل لازم است هم جانب بی‌خطری و هم بیشترین بازده را در نظر داشته باشند.

منابع

۱. ژان ولاگ، ژیری استودولا. ترجمه ساعد زمان. *گیاهان دارویی*. انتشارات دانشگاه تهران. ۱۳۷۶، صحفه ۳۰۹.

۲. زرگری علی. *گیاهان دارویی*. چاپ ششم، موسسه انتشارات دانشگاه تهران. ۱۳۷۵، جلد سوم، صفحات ۳۸-۳۴.

3. Lirussi F, Beccarello A, Zanette G, De Monte A, Donadon V, Velussi M, Crepaldi G. Silybin-beta-cyclodextrin in the treatment of patients with diabetes mellitus and alcoholic liver disease. Efficacy study of a new preparation of an anti-oxidant agent. *Diabetes Nutr. Metab.* 2002; 15: 222-31.

4. Agrawal S, Bonkovsky HL. Management of nonalcoholic steatohepatitis: an analytic review. *J. Clin. Gastroenterol.* 2002; 35: 253-61.

5. Lucena MI, Andrade RJ, Cruz JP, Rodriguez-Mendizabal M, Blanco E, Sanchez de la Cuesta F. Effects of silymarin MZ-80 on oxidative stress in patients with alcoholic cirrhosis. Results of a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical study. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 2002; 40: 2-8.

6. Cooray HC, Janvilisri T, van Veen HW, Hladky SB, Barrand MA. Interaction of the breast cancer resistance protein with plant polyphenols. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004; 317: 269-75.

7. Singh RP, Agarwal R. Prostate cancer prevention by silibinin. *Curr. Cancer. Drug. Targets*. 2004; 4: 1-11.

8. Gallo D, Giacomelli S, Ferlini C, Raspaglio G, Apollonio P, Prislei S, Riva A, Morazzoni P, Bombardelli E, Scambia G. Antitumour activity of the silybin-phosphatidylcholine complex, IdB 1016, against human ovarian cancer. *Eur. J. Cancer*. 2003; 39: 2403-10.

9. Thelen P, Wuttke W, Jarry H, Grzmil M, Ringert RH. Inhibition of telomerase activity and secretion of prostate specific antigen by silibinin in prostate cancer cells. *J. Urol.* 2004; 171: 1934-8.

10. Somogyi A, Ecsedi GG, Blazovics A, Miskolczi K, Gergely P, Feher J. Short term treatment of type II hyperlipoproteinaemia with silymarin. *Acta. Med. Hung.* 1989; 46: 289-95.

11. Srinivasan P, Vadhanam MV, Arif JM, Gupta RC. A rapid screening assay for antioxidant potential of natural and synthetic agents in vitro. *Int. J. Oncol.* 2002; 20: 983-6.

12. Flora K, Hahn M, Rosen H, Benner K. Milk thistle (*Silybum marianum*) for the therapy of liver disease. *Am. J. Gastroenterol.* 1998; 93: 139-43.

13. Wagner H, Horhammer L, Seitz M. Chemical evaluation of a silymarin-containing flavonoid concentrate from *Silybum marianum* (L.) Gaertn. *Arzneimittelforschung*. 1968; 6: 696-8.

۱٤. امیدبیگی رضا. بررسی تولید سیلی‌مارین و سیلی‌بین در گیاه ماریتیغال با کشت بذور وحشی و زراعی آن. *مجله علوم کشاورزی ایران*. ۱۳۷۷، جلد ۲۹، شماره ۲.