

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^۴، محمدرضا شمس‌اردکانی^۵

- ۱- دانشجوی دکتری فیزیولوژی گیاهی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه تربیت معلم، تهران
 ۲- استاد، گروه زیست‌شناسی، 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 فارماکونوزی، 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 فلاونویدی 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 فلاونویدی 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.

کلواژگان: فلاونولیگنان، سیلی‌بین، سیلی‌مارین، خارمریم



مقدمه

خار مریم^۱ گیاهی یک یا دو ساله از خانواده کاسنی، دارای ریشه ضخیم و ساقه‌ای منشعب با ارتفاع ۰/۸ تا ۱/۵ 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 فلاونولیکان‌هایی است که به عنوان داروی محافظ کبدی مورد استفاده قرار گرفته است [۱]. این ترکیبات شامل سیلی‌بین^۲ (سیلی‌بین A و B، ایزوسیلی‌بین^۳ A و B) سیلی کریستین^۴، سیلی‌دیانی^۵ و تاکسی‌فولین^۶ می‌باشند که مجموعاً سیلی مارین 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 فلاونوئیدهای این گیاه پرداخته و موفق به جداسازی و مطالعه این فلاونوئیدها شدند [۲]. تایتل و همکاران نیز در ۱۹۷۷ به مطالعه این فلاونوئیدها از طریق HPLC پرداختند [۶]. وگنر و همکاران در ۱۹۷۴ و ۱۹۶۸ مطالعه و آنالیز سیلی مارین در این گیاه را انجام دادند [۷،۸]. در سال‌های اخیر مطالعات زیادی در مورد نحوه عمل داروی سیلی مارین در موش و انسان انجام شده است [۹،۱۰].

مطالعات زیادی نشان داده که سیلی‌بین ترکیب اصلی ماده سیلی مارین می‌باشد اگر چه سیلی‌دیانی و سیلی کریستین نیز دارای خواص آنتی‌اکسیدان هستند [۱۱،۱۲]. نتایج مطالعات نشان می‌دهد که سیلی مارین اگر به صورت ترکیبی از سیلی‌بین به همراه ترکیبات سیلی‌دیانی و سیلی کریستین باشد نسبت به زمانی که 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 لاقل 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 [۱۷،۱۵]. 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 و در گل‌خانه و در محل پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی در کرج کشت شده بود به سه روش اسپکتروفتومتری، TLC و HPLC از نظر مقدار سیلی مارین 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). بذرها 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 سیلی مارین آنها به روش زیر استخراج و مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. به منظور استخراج سیلی مارین 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 اثر در سوکسله قرار گرفتند. پس از جداسازی روغن باقی‌مانده نمونه‌ها کاملاً خشک و سپس به مدت ۱۶ ساعت با استفاده از متانول جهت استخراج سیلی مارین 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 سیلی مارین به روش اسپکتروفتومتری

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

¹ *Silybum marianum* (L.) Gaertn.

² Silybin

³ Isosilybin

⁴ Silychristin

⁵ Silydianin

⁶ Taxifolin



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، سیلی کریستین، 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 کارایی بالا استفاده شد [۱۹، ۲۰، ۲۱]. این دستگاه از کارخانه Knauer شامل پمپ K1001، دکتور 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 C₁₈ به قطر ذرات ۵ μm و ابعاد 150 × 4.6mm 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 طوری که 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

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 میلی‌لیتر از این محلول به لوله سانتی‌فیوژ منتقل و ۲۰ میلی‌لیتر متانول به آن اضافه و سانتی‌فیوژ شد. محلول رویی حاصل از سانتی‌فیوژ را به بالن ۵۰ میلی‌لیتری منتقل نموده و با افزودن ۲۰ میلی‌لیتر متانول به لوله سانتی‌فیوژ دوباره سانتی‌فیوژ 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 ۱۰۰ میلی‌لیتری 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 ($A = 1\% \text{ cm}$). محاسبه درصد سیلی‌مارین طبق رابطه ذیل به دست می‌آید:

$$M \times 100 \times A\% / 1\text{cm} = A \times 10 \times 50 \times 50 \times 100 \text{ درصد سیلی‌مارین}$$

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 و سیستم حلال حاوی کلروفرم، استون، فرمیک اسید به نسبت ۹:۴:۱ 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^۱ 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، سیلی کریستین، سیلی‌دیانین، تاکسی‌فولین، نارینجین (پیش‌ساز) و کوماریلیک اسید (پیش‌ساز) که تحت

¹ Natural Product



به لکه‌ها در جدول شماره ۳ ارایه گردیده است. در این روش سیلی بین A و B. ایزوسیلی بین A و B در طی صفحه سیلیکاژل به طور جداگانه حرکت کرده‌اند.

جهت تعیین مقدار کمی فلاونولیکان‌های 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 سیلی بین A و B، ایزوسیلی بین A و B به راحتی از یکدیگر جدا شده و قابل بررسی می‌گردند.

گل‌خانه و رقم با منشا مجارستان تفاوت چندانی نداشته است. مقدار سیلی مارین 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 سیلی مارین 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

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'	۲۵	۳۹	۹	۲۱
۳	رودبارک	۱۱۸۰	۵۱° ۷'	۳۶° ۲۹'	۱۸	۳۶	۱۸	۵۱
۴	بنفشه‌ده	۱۰۴۰	۵۱° ۱۵'	۳۶° ۳۱'	۲۲	۲۶	۵۲	۷۳
۵	ولشت	۸۳۰	۵۱° ۱۸'	۳۶° ۳۳'	۲۹	۳۹	۶۱	۹۳
۶	مرزن‌آباد	۴۶۰	۵۱° ۱۸'	۳۶° ۲۷'	۲۲	۲۶	۱۰	۵۵
۷	حسن‌آباد	۴۰۰	۵۱° ۲۱'	۳۶° ۲۸'	۲۲	۲۶	۱۰	۵۵
۸	ولی‌آباد	۱۰۰	۵۱° ۱۸'	۳۶° ۱۵'	۲۰	۳۰	۶۰	۶۵
۹	خرم‌آباد	۱۵۶۰	۴۸° ۲۲'	۳۳° ۲۹'	۱۶	۳۷	۱۰	۴۳
۱۰	اهواز	۱۲۰	۴۸° ۴۰'	۳۱° ۲۰'	۲۵	۳۹	۹	۲۱
۱۱	کازرون	۵۳۰	۵۳° ۳۳'	۲۹° ۳۶'	۱۸	۳۶	۱۸	۵۱
۱۲	بrazجان	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	۲۶	۱۰	۵۵
۱۵	کرج	۱۳۱۲	۵۰° ۵۶'	۳۵° ۴۷'	۲۰	۳۰	۶۰	۶۵

می‌شود که باز هم نسبت به نمونه‌های منطقه بوشهر و نمونه‌های مجاری رسیده کرده در گل‌خانه تفاوت بسیاری دارد.

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

مقدار ایزوسیلی بین 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 ایزوسیلی بین A بیشتر از ایزوسیلی بین 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 سیلی دینان در دانه‌های مربوط به برازجان (بالاترین مقدار) و نمونه‌های مجاری، خرم‌آباد و کازرون نسبت به مقدار این ماده در دانه‌های مناطق اهواز، بوشهر و گل‌خانه تفاوت معنی‌داری دارد. مقدار سیلی کریستین در دانه‌های مجاری بالاترین مقدار و در بقیه مناطق تفاوت معنی‌داری وجود ندارد و دانه‌های برازجان و خرم‌آباد فاقد این ماده بودند.

نتایج نشان می‌دهد که بالاترین مقدار تجمع سیلی مارین در دانه‌های مربوط به منطقه برازجان است (جدول شماره ۵). از نظر آماری تفاوت معنی‌داری با مقدار سیلی مارین 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 سیلی مارین در دانه‌های با منشای مجاری که در شرایط گل‌خانه و کنترل شده کشت گردیده بودند بسیار پایین بود.

مهمترین فلاونولیکان‌های تجمع یافته در دانه‌های مربوط به منطقه برازجان، سیلی بین A, B می‌باشند که دارای نسبت ۷۵ و ۲۵ درصد هستند و با توجه به اهمیت حضور این ترکیب از نظر خواص دارویی و درمانی سیلی مارین این نکته حایز اهمیت بسیاری می‌باشد، به طوری که مقدار سیلی بین A, B 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 سیلی بین B در مناطق خرم‌آباد و برازجان دیده



جدول شماره ۲- مقایسه میانگین مقدار سیلی مارین در میوه‌های رسیده گیاهان خارمریم جمع‌آوری شده از مناطق مختلف کشور و رقم مجاری شماره ۱۶ به روش اسپکتروفوتومتری (آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح خطای ۵ درصد)

شماره نمونه	میانگین (میلی گرم 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	۳۵/۱۲ab	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 روش TLC

فلاونولیگنان‌ها

تاکسی فولین	سیلی کریستین	سیلی دیانین	سیلی بین A	سیلی بین B	ایزوسیلی بین A	ایزوسیلی بین B	R _F
۰/۴۵	۰/۴	۰/۵۵	۰/۶	۰/۶	۰/۶۵	۰/۶۵	

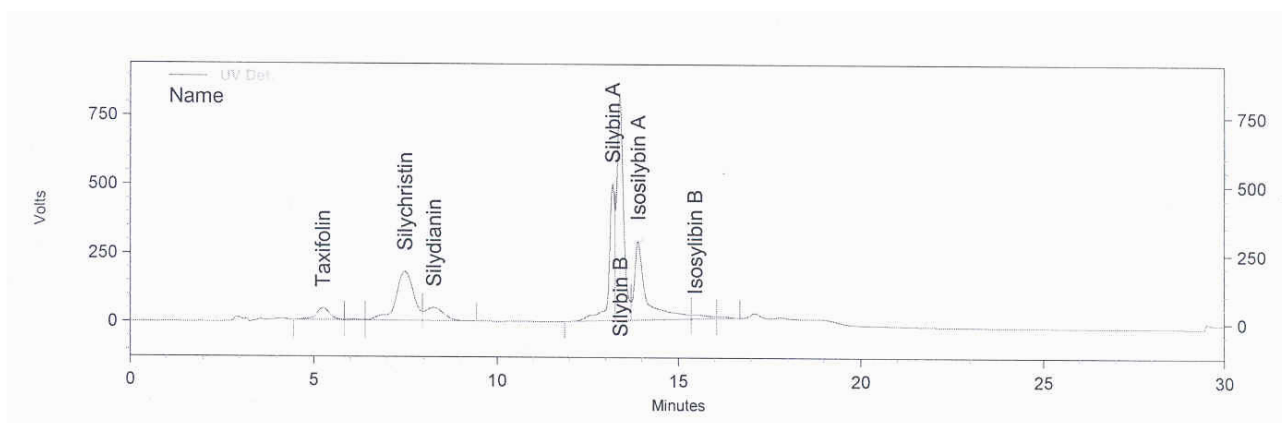
جدول شماره ۴- برنامه سیستم حلال‌ها در دستگاه HPLC

زمان (دقیقه)	متانول	استونیتریل	آب (pH= ۲/۳) با ۱۰ H PO 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 فلاونولیکتانها (میلی گرم بر گرم ماده خشک) در میوه‌های رسیده گیاه خارمریم از نواحی مختلف ایران و نمونه مجاری

نمونه	مقدار فلاونولیکتانها						
	تاکسی فولین	سیلی کریستین	سیلی دیانین	سیلی بین A	سیلی بین B	ایزوسیلی بین A	ایزوسیلی بین B
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
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
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
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
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
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
۷	۰/۷۳۹ ± ۰/۰۱	۰/۴۶۵ ± ۰/۰۱	۰/۵۳۲ ± ۰/۰۳	۱/۴۳۴ ± ۰/۴۹	۳/۹۲۵ ± ۰/۴۰	۴/۱۴۰ ± ۰/۲۲	۰/۰۰۰
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
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
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
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
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
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
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
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
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



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



بیوسنتز سیلیبین نقش دارد. این آنزیم یک نقطه کلیدی در کنترل متابولیسم این مسیر بیوسنتزی است. سطح آنزیمی و mRNA چالکون سنتتاز 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 فلاونویدی 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 چرخه 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.

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 محیط‌اشان هستند و مطابق نتایج بسیاری از محققان فلاونوئیدها نیز از جمله متابولیت‌های ثانویه‌ای هستند که مسیر بیوسنتزی آنها تحت تاثیر شرایط 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 سنتتاز آنزیمی است که در مرحله اتصال ۳ واحد استیل از مالونیل کوانزیم A با ۴ هیدروکسی‌سیتامیل کوانزیم A برای تولید نارینجین به عنوان پیش‌ساز تولید تاکسی‌فولین در مسیر

منابع

1. Alikaridis F, papadakis D, Pantelia K, and Kephelas T. Flavonolignan production from *Silybum marianum* transformed and untransformed root. *culture*. 2000; 71: 379-384.
2. Baker H, Schrrall R. Tissue and Suspension Culture of *Silybum marianum*. I. 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, a plant 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 separation 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*, *Arzheimittelforschung*. 1974; 24: 466-71.
8. Wagner H, Horhammer L, Seitz M. Chemical evaluation of a silymarin-containing flavonoid concentrate from *Silybum marianum*. *Arzheimittelforschung* 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. Chlopcikova S, Psotova J, Miketova P. Chemoprotective effect of plant phenolics against anthracycline-induced toxicity on rat cardiomyocytes. part I. Silymarin and its flavanolignans. *Phytoter. Res.* 2004; 18: 107-110.
11. Bourgard 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 hypercholesterolemia in rats. *Planta media.* 1998; 64: 138-142.
14. Lee DY, Liu Y. Molecular structure and stereochemistry of silybin A, silybin B, isosilybin A, isosilybin B, 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. Ecological 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.
18. 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.

