بررسی استفاده از آب در استخراج سیلی‌مارین از دانه‌های گیاه خارمریم

(*Silybum marianum* L. Gaertn)

طاهره حسنلو و روشنک سپهری فر*

بخش فیزیولوژی، مؤسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی، ابتدای جاده ماهدشت، کرج

چکیده

سیلی‌مارین ترکیبی دارویی است که از دانه‌های گیاه دارویی خار مریم (*Silybum marianum* (L.) Gaertn) استخراج و در درمان بیماری‌های کبدی, دیابت نوع II و کلسترول بالا استفاده می‌شود. به منظور استخراج سیلی‌مارین از حلال‌های آلی همچون متانول, اتانول, استونیتریل و استون استفاده می‌گردد. در این تحقیق به منظور مقایسه استفاده از حلال آب با توجه به ارزانی, سهولت و بی خطر بودن به عنوان یک حلال مناسب پیشنهاد شده است. لذا با روش‌های مختلف, مقدار و نوع ترکیب‌های فلاونولیگنانی عصاره آبی استخراج شده از دانه‌های گیاه خار مریم توسط روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که بیشترین مقدار تاکسی فولین, سیلی کریستین و سیلی دیانین استخراج شده (به ترتیب ۰/٦، ۰/۹ و ۲/۳ میلی گرم در گرم ماده خشک) با استفاده از روش سوکسله با آب بعد از انجام یک مرحله چربی‌زدایی می‌باشد. بیشترین مقدار سیلی‌بین و ایزوسیلی‌بین استخراج شده (به ترتیب ۰/۲٤ , ۰/۱۵ میلی گرم در گرم ماده خشک) با استفاده از روش سوکسله با آب بدون انجام چربی زدایی قبل از استخراج می‌باشد. در مقایسه با متانول به عنوان حلال مقدار ماده استخراجی با آب بسیار پایین تر بود. به منظور افزایش بازده, با تغییر روش وافزایش زمان استخراج می‌توان در آینده به نتایج بهتری دست یافت.

کلمات کلیدی: خار مریم، سیلیمارین، حلال

مقدمه

سیلی‌مارین ترکیبی از فلاونوئیدها می‌باشد که از عصاره متانولی میوه‌های خشک شده (دانه) گیاه دارویی خارمریم به میزان ٤ تا ٦ درصد استخراج می‌شود (Samuelsson et al.1999; Kren et al. 2000; Narayana et al. 2001; Katiyar, 2002).

پنج ماده مؤثر موجود در عصاره میوه این گیاه شامل سیلی‌بین (SBN)، ایزوسیلی‌بین (ISBN)، سیلی‌کریستین (SCN)، سیلی‌دیانین(SDN) و تاکسی فولین (TXF) می‌باشند (Ding et al. 2001; Samuelsson, 1999) سیلی‌بین و ایزوسیلی‌بین مخلوطی از دو دی آستروایزومر هستند که دارای شکل یکسانی در موقعیت C_2 و C_3 و یک تفاوت در ناحیه $\acute{C}_2$ و C'_3 می‌باشند (Ding et al., 2001). سیلی‌بین، که به نام

*e.mail: thasanloo@yahoo.com

سیلی‌بینین نیز شناخته شده است، ترکیب اصلی (۷۰-۵۰ درصد) سیلی‌مارین از نظر کمی و خاصیت دارویی می‌باشد (Kahol et al. 1997; Venkataramanan et al. 2000; Kren et al. 2000; Schenfeld et al. Li et al., 2005) و تاکسی فولین که از ترکیب فلاونوئیدی نارینجنین مشتق می‌شود به عنوان پیش‌ساز در مسیر بیوسنتز سیلی‌بین مشارکت می‌کند (Samuelsson, 1999; S?nchez-Sampedro et al. 2007; Cacho et al. 1999) سیلی‌مارین به عنوان داروی محافظ کبدی در درمان بیماری‌های مختلف کبدی (سیروز، کبد چرب، التهاب مجرای صفرا، هپاتیت ویروسی و سمی مزمن) استفاده می‌شود(Keren et. al., 2000 ; Sonnenbichler 1999 et al.,) به نظر می‌رسد این عملکرد سیلی‌مارین مربوط به خواص آنتی‌اکسیدانی آن باشد (Alikaridis et al., 2000). مطالعات اپیدمیولوژی در سال‌های اخیر مشخص ساخته که مصرف آنتی‌اکسیدان ها امکان ابتلا به بیماری‌های قلبی - عروقی و سرطان‌ها را کاهش می‌دهد (ولاگ، ۱۳۷٦).

در مورد استخراج ترکیب‌های فلاونوئیدی از جمله سیلی‌مارین از میوه‌های گیاه خارمریم تحقیقات زیادی انجام گرفته است (Wagner et al., 1974 &1968) و ترکیب‌های فعال در سیلی‌مارین به روش‌های HPLC, TLC , RP-LC و LC/MS و الکتروفورز موئینه‌ای تایید شد (Title &Wagner, 1997; Minakhmetov et al., 2001; Quaglia et al., 1999؛ حسنلو و همکاران, ۱۳۸۳). ترکیب‌های با ارزش عمدتاً با استفاده از حلال‌های آلی از منابع طبیعی استخراج می‌شوند, علی‌رغم بازده استخراج بالا از سمیت نسبی نیز برخوردار هستند. در زمینه استخراج سیلی‌مارین توسط حلال‌های مختلف، تحقیقات جالب توجهی انجام شده است که قابلیت حلال‌های مختلف آلی و آبی را در استخراج سیلی‌مارین مورد مطالعه قرار گرفته شد.در این میان استفاده از آب به عنوان حلال کم خطر و ارزان پیشنهاد شده است (Kahol et al. 2003; Benthin et al. 1999؛ ضیایی و همکاران, ۱۳۸۳). به منظور تعیین شرایط بهینه استخراج تاثیر درجه حرارت‌های مختلف بر استخراج سیلی‌مارین با استفاده از آب مورد مقایسه قرار گرفته شده است (Duan et Alvarezbarreto et al, 2003 ;al., 2004). در این پژوهش با توجه به تجربیات موجود در این زمینه روش‌های مختلف استخراج سیلی‌مارین با آب به دو صورت با انجام مرحله چربی‌زدایی یا بدون انجام مرحله چربی‌زدایی مورد بررسی قرار گرفت و اجزا سیلی‌مارین استخراج شده از نظر کمی و کیفی مطالعه شد.

مواد و روش‌ها

تهیه دانه‌های گیاه خار مریم

دانه‌های اصلاح شده گیاه خارمریم با منشاء مجارستان از پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی تهیه شدند.

استخراج فلاونولیگنان‌ها از دانه‌های گیاه خارمریم

به منظور استخراج سیلی‌مارین از دانه‌های گیاه خارمریم، ۳ گرم از دانه‌های خشک شده در داخل یک هاون چینی ساییده شدند، سپس به ٦ روش مطابق جدول ۱ استخراج انجام شد. لازم به ذکر است که روش‌های ۲،۱ و ۳ در سه زمان مختلف (۳،۱ و ٦ ساعت) انجام گردید و دمای اعمال شده ۱۰۰°C بود.

جدول ۱: روش‌های مختلف استخراج سیلی‌مارین

روش استخراج	چربی زدایی با استفاده از پترولئوم اتر	استخراج سیلیمارین
۱	-	آب (۱۰۰°C)
۲	+	بن ماری(۱۰۰°C)
۳	-	بن ماری(۱۰۰°C)
٤	+	سوکسله با آب (۱۲ ساعت)
٥	-	سوکسله با آب (۱۲ ساعت)
٦	+	سوکسله با متانول (۱۲ ساعت)

(+):چربی زدایی شده: (-):چربی زدایی نشده

اندازه‌گیری فلاونولیگنان‌های استخراج شده از دانه گیاه خار مریم به روش کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا (HPLC)

به منظور بررسی دقیق‌تر و تعیین کمی ترکیب‌های از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا استفاده شد (Bourgand et al. 2001; Brenda, Bosisio et al. 1992; Hasanloo et al. 2005; 2000). این دستگاه از کارخانه Knauer شامل پمپ K1001، دتکتور UV مدل K2501 و نرم‌افزار EuroChromge بود. ۲۰ میکرولیتر از نمونه‌های استخراج شده که به نسبت ۱ به ۱۰ رقیق شده بودند به دستگاه تزریق شدند و با فاز متحرک متانول و آب اسیدی شده با اسید فسفریک ۱۰٪ (pH2.6) و با جریان یک میلی‌لیتر در دقیقه از ستون Eurospher-100 C_{18} به قطر ذرات ۵ µm و ابعاد ۲۵۰×٤/٠ mm عبور کرده و در طول موج ۲۸۸ نانومتر اندازه گیری و شناسایی شدند. کل زمان هر تجزیه ۱۰ دقیقه بود. زمان خروج منحنی های مربوط به ترکیب‌های فلاونولیگنان در مقایسه با استانداردهای سیلی‌بین(سیگما)، سیلی‌کریستین(فیتولب)، سیلی‌دیانین(فیتولب) و تاکسی-فولین(سیگما) مقایسه شده و چون استاندارد ایزو سیلی‌بین موجود نبود مقادیرایزوسیلی بین بر اساس منحنی استاندارد سیلی‌بین استاندارد محاسبه گردید (Samuelsson et al. 1999).

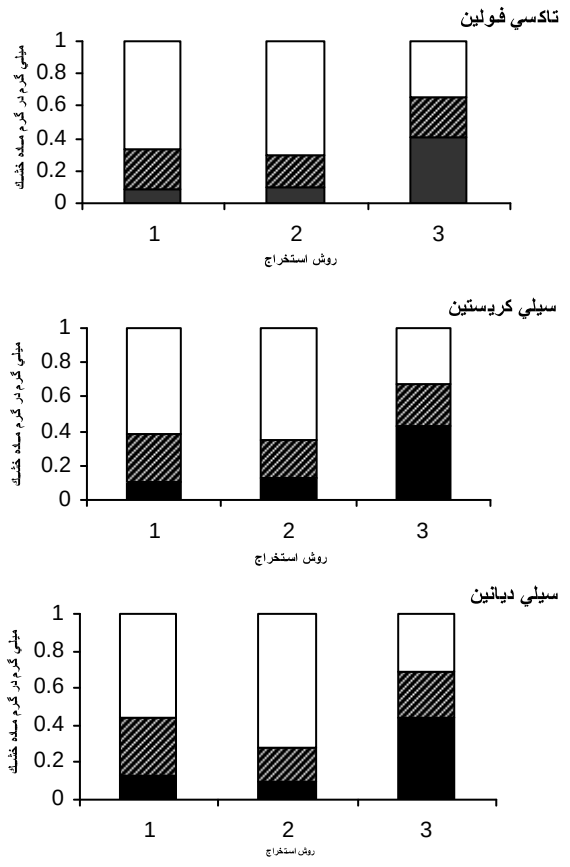
برای انجام آزمون‌های آماری از نرم افزار SAS استفاده شد و اختلاف آماری در طرح کاملا تصادفی با استفاده از آزمون دانکن در سطح خطای ۵ درصد محاسبه گردید.

نتایج و بحث

استخراج سیلی‌مارین در طی دو مرحله چربی‌زدایی با پترولیوم اتر و سپس سوکسله با متانول انجام می‌گیرد (Wallace et al., 2003). استخراج سیلی‌مارین تحت فشار نیز انجام شده است (Benthin et al., 1999). بر اساس نتایج گزارش شده با افزایش زمان چربی زدایی مقدار ماده استخراجی افزایش یافته است (Wallace et al., 2005) استفاده از آب داغ به عنوان حلال استخراجی ترکیب‌های قطبی از منابع گیاهی اخیراً مورد توجه تعدادی از محققان قرار گرفته است. طبق تحقیقات انجام شده دمای مناسبجهت استخراج سیلی‌مارین با آب داغ ۱۰۰°C می‌باشد و با بالاتر رفتن دما از این مقدار استخراج اجزاء سیلی‌مارین بیشتر نشد, که احتمالاً به علت تخریب ساختمان این ترکیبات می‌باشد و هنگامی که درجه حرارت از ۱۰۰°Cبه ۱٤۰°C می‌رسد زمان استخراج می‌بایستی از ۲۰۰ دقیقه به ۵۰ دقیقه تقلیل یابد (Basile et al. 1998; Kubatova et al. 2001; Duan et al. 2004; Alvarezbarreto et al. 2003).

نتایج نشان می‌دهد که در روش استخراج ۱ مقدار تاکسی‌فولین استخراج شده پس از شش ساعت بالاترین مقدار بوده است (۰/۱٦ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک), در حالی که در روش ۲ و ۳ در همین مدت زمان به ترتیب ۰/۲۳ و ۰/۲٤ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک تاکسی‌فولین استخراج شده است. البته در روش استخراج ۳ در مدت زمان یک ساعت نیز مقدار تاکسی‌فولین در روش‌های استخراج ٤، ۵ و ٦ به ترتیب ۰/٦۳ و ۰/۳۲ و ۱/۷۳ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک بود و بر اساس نتایج به دست آمده بیشترین مقدار استخراج در روش ٦ (استخراج با متانول) به دست آمده است. در مجموع در روش‌های استخراج که فقط از آب استفاده شده است روش ٤ که پس از چربی زدایی از نمونه‌ها توسط سوکسله با آب به مدت ۱۲ ساعت انجام گرفته بهترین روش می‌باشد و تاکسی‌فولین استخراج شده نسبت به روش ۵ که بدون چربی زدایی استخراج با آب و سوکسله انجام شده حدود دو برابر می‌باشد که حاکی از اهمیت مرحله چربی زدایی در استخراج تاکسی‌فولین می‌باشد (شکل ۱). بیشترین مقدار سیلی‌کریستین استخراج شده با استفاده از آب به عنوان حلال روش ۳ می‌باشد (۰/۳ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک) که نمونه‌ها بدون چربی زدایی با استفاده از بن ماری ۱۰۰ °C در مدت یک ساعت استخراج شدند (شکل ۱). در روش ۱ و ۲ با افزایش زمان استخراج از یک به شش ساعت مقدار ماده استخراجی افزایش یافت. مقایسه روش ٤ و ۵ نشان می‌دهد که مقدار استخراج سیلی‌کریستین در روش٤ , ۰/۹ میلی‌گرم بر گرم ماده

خشک و بیشتر از روش ۵ (۰/۵۳ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک) می‌باشد. مقدار استخراج سیلی‌کریستین به روش ٦, ٤/٩ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک می‌باشد (شکل ۱). مقدار سیلی‌دیانین استخراج شده با آب در روش ۲ و ۳ و در زمان شش ساعت بالاترین مقدار و به ترتیب ۰/۸ و ۰/۷۹ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک به دست آمد و بین دو روش مختلف که بدون چربی زدایی و با چربی زدایی و استفاده از آب به عنوان حلال در روش‌های ٤ و ۵ بود تفاوت مشاهده شد, به طوری که مقدار سیلی‌دیانین استخراج شده به ترتیب ۲/۵۳ و ۱/۱۳ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک بود. با استفاده از روش٦, مقدار ۷/٤۲ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک, سیلی‌دیانین استخراج شد (شکل ۱).

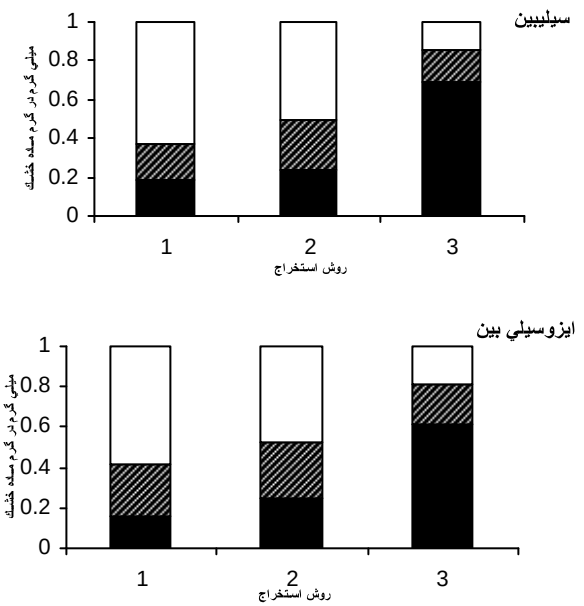


شکل ۱: مقایسه مقدار تاکسی فولین, سیلی کریستین و سیلی دیانین استخراج شده از دانه‌های گیاه خار مریم در ۳ روش(مطابق جدول۱) و ۳ زمان استخراج(۱!; ۳ϕ و ٦ ∀ ساعت)

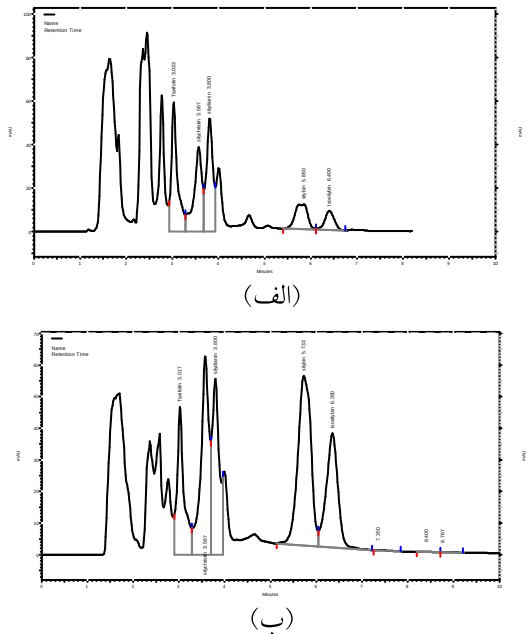
مقایسه سیلی‌بین استخراج شده در روش‌های مختلف نشان داد که در روش ۳ و یک ساعت پس از استخراج ۰/۱۱ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک سیلی‌بین استخراج شد و در روش‌های ۱ و ۲ با بالا رفتن زمان, مقدار ماده استخراج شده بالاتر بود. مقدار سیلی‌بین استخراج شده در روش ٤ و ۵ به ترتیب ۰/۱۲ و ۰/۲٤ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک بود و بر اساس نتایج به دست آمده مقدار استخراج سیلی‌بین در روش ۵ که نمونه‌ها بدون چربی زدایی توسط سوکسله و آب استخراج شده بودند بالاتر بود. با استفاده از روش ٦ مقدار ٦/۳۲ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک سیلی‌بین استخراج شد. مقدار ایزوسیلی‌بین استخراج شده در زمان استخراج شش ساعت در روش‌های ۱ و ۲ تفاوت چندانی نداشت و بیشترین مقدار ایزوسیلی‌بین استخراج شده با استفاده از روش ۳ یک-ساعت پس از استخراج (۰/۰۷۲ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک) بود, در روش ٤ و ۵ مقدار ایزوسیلی‌بین به ترتیب برابر ۰/۱۰ و ۰/۱۵ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک به دست آمد. در روش٦, ۳/۹۷ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک ایزوسیلی‌بین استخراج شد (جدول ۲).

مقایسه روش‌های مختلف استخراج با آب نشان داد که بیشترین مقدار سیلی‌بین و ایزوسیلی‌بین استخراج شده در روش ۵ می‌باشد. در این روش استخراج سیلی‌مارین با استفاده از آب و دستگاه سوکسله بدون چربی‌زدایی از نمونه‌ها انجام شد.

نتایج نشان داد که ترکیب هایی که قطبیت بیشتری داشتند (تاکسی‌فولین, سیلی‌کریستین و سیلی‌دیانین (Alvarezbarreto et al., 2003). در روش ۵ نسبت به روش ٤ به مقدار کمتری استخراج شدند و ترکیب هایی که قطبیت کمتری دارند (سیلی‌بین و ایزوسیلی‌بین) در روش ۵ نسبت به روش ٤ مقدار ماده بیشتری استخراج شدند (شکل۳).



شکل ۲: مقایسه مقدار سیلی‌بین و ایزو سیلی‌بین استخراج شده از دانه‌های گیاه خار مریم در ۳ روش(مطابق جدول ۱) و ۳ زمان استخراج(۱! ; ۳ϕ و ٦ ∀ ساعت)



(الف)

(ب)

شکل ۳: کروماتوگرام ترکیب‌های استخراج شده از دانه‌های گیاه خار مریم به روش‌های شماره ۵ (الف) و ٦ (ب) (مطابق جدول۱)

نسبت استخراج تاکسی‌فولین به سیلی‌بین کل در روش‌های ٤, ۵ و ٦ به ترتیب ۲/۸٦, ۰/۹٤ و ۰/۱٦ می‌باشد. به این ترتیب در بین روش‌های استخراج با آب توسط سوکسله به منظور استخراج سیلی‌بین روش ۵ نسبت به روش ٤ ارجحیت دارد و مقادیر سیلی‌بین، تاکسی‌فولین، سیلی‌کریستین و سیلی‌دیانین نسبت به مقادیر اعلام شده Wallace et al. (2002 Alvarezbarreto et al. 2003؛ ضیایی و همکاران، ۱۳۸۳) پایین‌تر می‌باشد که احتمالاً مربوط به نوع دانه‌های مورد بررسی می‌باشد.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به دست آمده بدون استفاده از مرحله چربی‌زدایی مقدار قابل توجهی سیلی‌مارین قابل استخراج می‌باشد. در حالی که براساس نتایج به دست آمده در روش استخراج با استفاده از استونیتریل و متانول مرحله چربی‌زدایی یک مرحله ضروری می‌باشد Kahol et al. 2001; Benthin et al. 1999).

استفاده از آب به عنوان حلال استخراج سیلی‌بین ضمن کاهش قیمت مراحل استخراج باعث افزایش امنیت نیز می‌گردد و تولید پودر سیلی‌مارین با استفاده از حلال مناسب کمترین سمیت و بیشترین بازده را داشته باشد(ضیایی, ۱۳۸۳) قطعاً مورد توجه قرار خواهد گرفت و در خاتمه انجام مطالعات بیشتردر روش‌های استخراج سیلی‌مارین با آب توسط متخصصان و استفاده از آب به عنوان حلالی بی خطر و ارزان به منظور تولید پودر سیلی‌مارین که یک پودر قابل استفاده در صنایع مختلف می‌باشد, توصیه می‌شود

جدول ۲: مقایسه مقدار فلاونولیگنان ها در ۳ روش استخراج

روش استخراج	فلاونولیگنان(میلی گرم در گرم ماده خشک)				
	تاکسی‌فولین	سیلی‌کریستین	سیلی‌دیانین	سیلی‌بین	ایزوسیلی‌بین
٤	۰/٦۳(±۰/۰۲)	۰/۹۰(±۰/۱۰)	۲/۳۵(±۰/۰۵)	۰/۱۲۳(±۰/۰۹)	۰/۱۰۹(±۰/۰٦)
٥	۰/۳۳(±۰/۰۸)	۰/۵۳(±۰/۰۷)	۱/۱۳(±۰/۱)	۰/۲٤۸(±۰/۰۸)	۰/۱٤۹(±۰/۰٥)
٦	۱/۷۳(±۰/۰۳)	٤/۹۸(±۰/۰٦)	۷/٤۲(±۰/۲)	٦/۳۲۸(±۰/۰۸)	۳/۹۷٤(±۰/۰۹)

روش استخراج مطابق جدول ۱

سپاسگزاری

ایـــن پـــژوهش در محـــل مؤســـسه تحقیقـــات بیوتکنولوژی کـشاورزی انجـام گردیـده اسـت. بدینوسـیله از ریاست محترم مؤسسه و همکاران محترم ایشان کـه امکانـات لازم جهت انجام طرح را در اختیار اینجانب قرار دادند تـشکر می‌نمایم.

منابع

حسنلو، ط.، خاوری نژاد، ر.ع.، مجیـدی، ا. و ضـیایی س. ع. (۱۳۸۳) مطالعه و تعیین فلاونولیگنان ها در میوه‌های گیاه خارمریم جمع آوری شده از نقاط مختلف ایران بـه روش‌هـای اسـپکتروفتومتری TLC و HPLC. فـصلنامه گیاهـان دارویـی، ویـژه نامـه خـارمریم، سـال چهـارم، صفحات ۲۵-۳۲.

ضیایی، **س. ع.، حسینی، ح. ف.، رجبیان، ط.، پور حسینی، ل.، نقدی بادی، ح. و رضـازاده، ش. (۱۳۸۳)** بررسـی اثر حلال‌های مختلف در استخراج سیلی‌مارین از بـذر گیـاه خـارمریم. فـصلنامه گیاهـان دارویـی، ویـژه نامـه خارمریم، سال چهارم، صفحات ۷-۱۲.

ولاگ، ژ. و استودولا، ژ.، ترجمه ساعد زمـان، س.(۱۳۷٦) گیاهان دارویی، انتشارات دانشگاه تهران، صفحه ۳۰۹.

Alikaridis, F., D. Papadakis, K. Pantelia and T. Kephalas (2000) Flavonolignan production from *Silybum marianum* transformed and untransformed root culture. Fitotrapia, 71: 379-384.

Alvarezbarreto, J., S. N. Wallace, D. J. Carrier and E. C. Clausene (2003) Extraction of nutraceuticals from milk thistle. I. Hot water extraction. Applied Biochemistry and Biotechnology, 105: 881-889.

Basile, A., M. Jimenez-Carmona and A. Clifford (1998) Extraction of rosemary by superheated water. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46: 5205-5209.

Benthin B., H. Danz and M. Hamburger (1999) Pressurized liquid extraction of medicinal plants. Journal of Chromatography A, 837: 211-219.

Bosisio, E., C. Benelli and O. Pirola (1992) Effect of the flavonolignans of *Silybum marianum* L. Gaertn on lipid peroxidation in rat liver microsomes and freshly isolated hepatocytes. Pharmacology Research, 25: 147-154.

Bourgand, F., A. Gravot, S. Milesi and E. Gontier (2001) Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. Plant Science, 161: 839-851.

Brenda, W.S. (2000) Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. Plant Physiology, 126: 485-493.

Briskin, D.P. (2000) Medicinal plants and phytomedicines. linking plant biochemistry and physiology to human health. Plant Physiology, 124: 507-514.

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

Ding, T.M., S.J. Tian Z.X. Zhang, D.Z. Gu, Y.F. Chen, Y.H. Shi and Z.P. Sun (2001) Determination of active component in silymarin by RP-LC and LC/MS. Journal of Phamaceutical and Biochemical Analysis, 26: 155-161.

Duan, L., D. J. Carrier and E. C. Clausen (2004) Silymarin extraction from milk thistle using hot water. Applied Biochemistry and Biotechnology, 114: 559-568.

Hasanloo, T., R. A. Khavari-Nejad, E. Majidi and M. R. Shams- Ardakani (2005) Analysis of flavonolignans in dried fruits of *Silybum marianum* (L.) Gaertn from Iran. Pakistan Journal of Biological Science, 8: 1778-1782.

Kahol, A., K. Singh, S. Tandon and S. Kumar (2001) Process for isolation of hepaprotective agent silymarin from the seeds of the plant *silybum marianum*. Indian Patent Number: 06309678.

Katiyar, S. K. (2002) Treatment of silymarin, a plant flavonoid, prevents ultraviolet light- induced immune suppression and oxidative stress in mouse skin. International Journal of Oncology, 21: 1213-1222.

Kren, V., J. Ulrichova, P. Kosina, D. Stevenson, P. Sedmera, V. Prikrylova, P. Halada and V. Simanek (2000) Chemoenzymatic preparation of silybin β- glucoronides and their biological evaluation. Drag Metobolism and Disposition, 28: 1513-1517.

Kubatova A., D. Miller and S. Hawthorne (2001) Selective extraction of oxygenated natural products with subcritical water. 10th International symposium and exhibit on supercritical fluid chromatography, extraction and processing. August 19-22, 2001. Myrtle Beach, SC, USA. E-05.

Li, W., K. Koike, Y. Asada, T. Yoshikawa and T. Nikaido (2005) Rosmarinic acid production by coleus *forskohlii* hairy root cultures. Plant Cell, Tissue and Organ Cultur, 80: 151-155.

Minakhmetov, R. A., L. A. Onuchak, V. A. Kurkin, E. V. Avdeeva and A. V. Volotsueva (2001) Analysis of flavonoids in *silybum marianum* fruit by HPLC. Chemistry of Natural Compounds, 3: 318-321.

Narayana, K.R., R. Sripal, M. R. Chaluvadi and D. R. Krishan, D.R. (2001) Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. Indian Journal of Pharmacology, 33:2-6.

Quaglia, M.G., E. Bossu, E. Donati, G. Mazzanti and A. Brandt (1999) Determination of silymarin in the extract from the dried *Silybum marianum* fruits by high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 19: 435-442.

Samuelsson, G. (1999) Drugs of natural origin. 4th revised edition. Swedish pharmaceutical press, Stockholm, Sweden. 226-233.

S?nchez-Sampedro, A., H.K. Kim, H.Y. Choi, R. Verpoorte and P. Corchete (2007) Metabolomic alterations in elicitor treated Silybum marianum suspension cultures monitored by nuclear magnetic resonance spectroscopy. J Biotechnol., 130: 133-142.

Schnfeld, J.V., B. Weisbrod and M. K. Muller (1997) Silibinin, a plant extract with antioxidant and membrane stabilizing properties protects exocrine pancreas from cyclosporine A toxicity. Cellular and Molecular Life Sciences, 53:917-920.

Sonnenbichler, J., F. Scaleram, I. Sonnenbichler and R. Weyhenmeyer (1999) Stimulatory effects of silibinin and silichristin form the Milk thistle *silybum marianum* on kidney cells. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 290: 1375-1383.

Titel, G. and H. Wagner (1977) High-performance liquid chromatographic seperation of silymarins and their determination in a raw extract of *silybum marianum*. Journal of Chromatography, 135: 499-501.

Venkataramanan, R. (2000) Milke thistle, a herbal supplement, decreases the activity of CYP3A4 and uridine diphosphoglucuronosyl transferase in human hepatocyte cultures. Drug Metabolism and Dispositions, 28: 1270-1273.

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

Wagner, H., L. Horhammer and M. Seitz (1968) Chemical evaluation of a silymarin-contaning flavonoid concentrate from *Silybum marianum*. Arzheimittel Forschung, 18: 696-8.

Wallace, S. N., D. J. Carrier and E. C. Clausen (2003) Extraction of nutraceuticals from milk thistle: part II. Extraction with organic solvents. Applied Biochemistry Biotechnology, 105: 891-903.

Wallace, S. N., D. J. Carrier and E. C. Clausen (2005) Batch solvent extraction of flavanolignans from milk thistle (*Silybum marianum* L. Gaertn). Phytochemical Analysis, 16: 7-16

Evaluation of silymarin extraction from *Silybum marianum* (L.) Gaertn seeds by water

Hasanloo, T. and Sepehrifar, R.

Department of Plant Physiology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Mahdasht Road,

Abstract

The seeds extract of *Silybum marianum* (L.) Gaertn is named silymarin and used in treatment of liver diseases, diabetes (II) and hypercholesterolemia. There are different solvents (methanol, ethanol, acetonitrile and acetone) for extraction of this compound. Water is an inetersting alternative because of its low operating and disposal costs. This study was undertaken to evaluate the efficiency of different methods on silymarin production and followed by HPLC analysis of extracted flavonolignans. The highest content of taxifolin, silychristin and silydianin were 0.63, 0.9 and 2.35 mg g^{-1} DW, respectively in a soxhlet extraction with water for 12 h after a pre-treatment step involving defatting with petroleum ether. The highest content of silybin and isosilybin were extracted 0.24 and 0.15 mg g^{-1} DW in a soxhlet extraction with water without defatting process. Although the ratio of the extracted componds with water were less than methanolic extraction, for increasing the quality of the products, the water extraction steps should be well studied both in terms of time and methods.

Keywords: *Silybum marianum* (L.) Gaertn, silymarin, Solvent