DOI: http://dx.doi.org/10.22092/ijmapr.2014.2929

فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۲۸، شمارهٔ ٤، صفحهٔ ۷۵۵-۷٤۱ (۱۳۹۱)

شناسایی و تعیین مقدار فیتواسترول‌ها در بذرهای روغنی جمعیت‌هایی از دو گونه گل‌گاوزبان (*Echium*) ایران

سکینه عباس‌زاده[۱]، طیبه رجبیان[۲*] و مسعود تقی‌زاده[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران
۲*- نویسنده مسئول، استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران، پست الکترونیک: rajabian@shahed.ac.ir
۳- استادیار، گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران

تاریخ دریافت: خرداد ۱۳۹۰ تاریخ اصلاح نهایی: تیر ۱۳۹۰ تاریخ پذیرش: تیر ۱۳۹۰

چکیده

فیتواسترول نامیست برای بسیاری از استرول های گیاهی که دارای فعالیت زیستی مؤثری در انسان ها هستند و به‌عنوان یک عامل پایین‌آورنده کلسترول می توانند در پیشگیری و مهار بیماری‌های قلبی-عروقی و همچنین انواعی از سرطان‌ها نقش داشته باشند. فیتواسترول‌ها به مقدار زیاد در روغن‌های بعضی گونه‌های گیاهی ازجمله جنس گل‌گاوزبان (*Echium*) از تیره گل‌گاوزبان (Boraginaceae) یافت می‌شوند. تاکنون در ایران ٤ گونه گل‌گاوزبان شناسایی شده‌است. با توجه به نقش منحصر به‌فرد فیتواسترول‌ها در سلامتی انسان، هدف پژوهش حاضر شناسایی و تعیین مقدار این ترکیب‌های دارویی در دو گونه گل‌گاوزبان ایران بود. بذرهای ٦ جمعیت از دوگونه گل‌گاوزبان ایرانی (*E. amoenum*) و گل‌گاوزبان ایتالیایی (*E. italicum*) از رویشگاه‌های طبیعی آنها جمع‌آوری شدند. وجود فیتواسترول‌ها در نمونه‌های بذر پس از استخراج با حلال‌های مناسب به روش TLC مورد مطالعه قرار گرفت و بعد مقدار آنها با روش‌های GC و طیف‌سنجی نوری تعیین شد. در روش طیف‌سنجی، مقدار فیتواسترول تام در نمونه‌ها با استفاده از معادله منحنی استاندارد بدست آمده از تغییرات جذب محلول‌های با غلظت‌های ۱/٤-۰ میلی‌گرم در لیتر استیگما استرول استاندارد در طول موج ٦٤۰ نانومتر تعیین شد. به روش GC، بیشترین مقدار فیتواسترول تام در بذر گل گاوزبان ایتالیایی، جمعیت الموت قزوین با ۳۹۹/٤ میلی‌گرم در ۱۰۰گرم وزن خشک و کمترین مقدار آن با ۱۱۲ میلی‌گرم در ۱۰۰گرم وزن خشک در بذر گل گاوزبان ایرانی، جمعیت هزارجریب بدست آمد. همچنین بتا-سیتواسترول (با بیش از ۵۰٪ فیتواسترول تام) و کمپسترول (۵۰-۲۰٪ فیتواسترول تام) به‌عنوان استرول‌های اصلی بذرها شناسایی شدند. بذر گل‌گاوزبان ایرانی، جمعیت بهشهر با ۱٤۱ میلی‌گرم/۱۰۰گرم وزن خشک بتا-سیتواسترول و بذر گل گاوزبان ایتالیایی، جمعیت الموت قزوین به‌ترتیب با ۲۱۲ و ۱٤۱/٤ میلی گرم/۱۰۰گرم وزن خشک کمپسترول و بتا-سیتواستانول، غنی‌ترین منابع از نظر فیتواسترول‌ها بودند.

واژه‌های کلیدی: گل گاوزبان (*Echium*)، تیره گل گاوزبان، فیتواسترول، طیف سنجی نوری، کروماتوگرافی لایه نازک، کروماتوگرافی گازی.

مقدمه

فیتواسترول ها، استرول های گیاهی و مولکول های فعال زیستی هستند که در گونه‌های مختلف گیاهان وجود دارند (Lagarda *et al*., 2006). این متابولیت‌ها در همه بافت های گیاهان عالی و با فراوانی بیشتر در بذرها یافت می‌شوند. آنها الکل‌های استروئیدی ۲۸ یا ۲۹ کربنه‌ای هستند که از یک ساختار تتراسیکلیک سیکلوپنتافنانترن تشکیل شده‌اند و به طور معمول دارای یک زنجیره جانبی بلند در کربن شماره ۱۷ می‌باشند (Liu *et al*., 2007). فیتواسترول‌ها هم از نظر عملکرد (مؤثر در پایداری دولایه‌های فسفولیپیدی در غشای سلولی) و هم از نظر ساختاری (هسته استروئیدی و گروه ۳ بتا-هیدروکسیل و پیوند دوگانه بین کربن ۵ و ٦) تری‌ترپن‌هایی مشابه با کلسترول هستند. زنجیر جانبی اغلب فیتواسترول های گیاهی شامل ۱۰-۹ اتم کربن به جای ۸ کربن در کلسترول است. فیتواسترول ها به‌صورت ٤- متیل استرول‌هایی از سری‌های کلستان طبقه‌بندی می‌شوند. در گیاهان بیش از ۲۰۰ نوع مختلف از فیتواسترول ها گزارش شده‌است که فراوانترین آنها: بتا-سیتواسترول (۲٤-α-اتیل کلسترول)، کمپسترول (۲٤-α- متیل کلسترول) و استیگمااسترول (Δ۲۲ و۲٤-α-اتیل کلسترول می باشند (شکل ۱). انواع دیگری از فیتواسترول‌ها مانند: آونااسترول (Δ^5avenasterol)، براسیکااسترول (brasicasterol)، بتا-سیتواستانول (β-sitostanol) و کمپستانول (campestanol) نیز شناسایی شده‌اند که به مقدار کمتر در گیاهان یافت می‌شوند (Fernandez & Cabral, 2007).

در طبیعت استرول‌ها به‌طور آزاد یا به‌صورت ٤ نوع همیوغ که در آنها گروه هیدروکسیل۳ بتا با یک اسید چرب یا با یک هیدروکسی سینامیک‌اسید استری می‌شود و یا با یک قند شش کربنی (به‌طور معمول گلوکز) و یا یک ٦-فتی آسیل هگزوزگلیکوزیلی می‌شود، وجود دارند. فراورده‌های غلات منابع طبیعی و عمده استرول‌های آزاد، استری شده و استرهای گلیکوزیدی می‌باشند. استرهای گلوکوزیدی فیتواسترول‌ها متداول‌ترین شکل یافت شده آنها در غلات هستند. براساس مطالعات انجام شده بر روی غلات در سوئد و هلند، میانگین استرول تام در آنها ٤۹ میلی‌گرم/۱۰۰ گرم می‌باشد. محتوای استرول تام در چاودار ۹۵/۵، در گندم ٦۹/۵، در جو دوسر ۷٦/۱ و در جو ٤٤/۷ میلی‌گرم/۱۰۰ گرم (وزن خشک) گزارش شده‌است. استرول غالب در این گیاهان را بتا-سیتواسترول (٦۲٪ محتوای فیتواسترول تام) تشکیل می‌دهد. مقادیر بسیار کمی از کمپسترول (۲۱٪)، استیگمااسترول (٤٪) و کمپستانول (۲٪) نیز در آنها یافت می‌شود. محتوای استرول‌های آزاد و استری شده در گندم زمستانه ۵۲/۸ میلی‌گرم/۱۰۰ گرم و مقدار استرول های گلیکوزیلی شده ۱۱۲/٦ میلی‌گرم/۱۰۰ گرم برآورد شده‌است. فیتواسترول‌ها در مغزها و بذرهای سایر گیاهان نیز یافت می شوند. بیشترین مقدار فیتواسترول تام در مغزها و بذرهای مورد استفاده در مواد غذایی در آمریکا، در کنجد و ژرم گندم (٤۱۳-٤۰۰ میلی گرم/۱۰۰ گرم) و کمترین مقدار آن در بادام برزیلی (*Bertholletia excels*) (۹۵ میلی‌گرم/۱۰۰ گرم) گزارش شده‌است. بتا-سیتواسترول فراوانترین استرول در مغزها (گردو، بادام، بادام‌زمینی و فندق) بود و مقدار استرول تام در آنها بین ۹۹/۱۲ تا ۲۰۷/۱۷ میلی‌گرم/۱۰۰ گرم وزن خشک تغییر می‌کرد. در گردو وجود کمپسترول (٦ میلی گرم/۱۰۰ گرم) و مقدار بسیار ناچیزی از استیگمااسترول گزارش شده‌است. مقدار استیگمااسترول در فندق ۳/۸۱ میلی‌گرم/

۱۰۰ گرم برآورد شده‌است. در روغن سویا وجود مقادیر قابل توجهی از استیگمااسترول (٦۱ میلی گرم/۱۰۰ گرم) و بتا-سیتواسترول (۱۱۸ میلی‌گرم/۱۰۰ گرم) گزارش شده‌است (Lagarda *et al*., 2006).

در مطالعه‌ای دیگر بر روی محتوای فیتواسترول‌ها و فیتواستانول‌های ۱۹ روغن گیاهی و ۱۲ مغز و بذر مشخص شد که میانگین فیتواسترول تام در روغن‌های گیاهی مورد مطالعه ۳٤۸ میلی گرم/۱۰۰ گرم (بیشترین مقدار در روغن ذرت با ۹۷۸ میلی‌گرم/۱۰۰ گرم و کمترین مقدار در روغن خرما با ۳۹ میلی گرم/۱۰۰ گرم) می باشد. در بین مغزها و بذرهای مورد بررسی نیز کنجد با ٤۰٤ میلی‌گرم/۱۰۰گرم بیشترین و میوه نارگیل با ٦۸ میلی گرم/۱۰۰ گرم کمترین مقدار فیتواستول تام را دارا بودند. کمترین مقدار کمپسترول در روغن ها، در روغن زیتون و خرما (۹ میلی‌گرم/۱۰۰ گرم) و در مغزها و بذرها، در کدو تنبل (۰ میلی‌گرم/۱۰۰ گرم) و بیشترین مقدار آن در روغن کلزا (۲۷۹ میلی‌گرم/۱۰۰ گرم) و در مغزها و بذرها، در کنجد (۷۰ میلی گرم/۱۰۰ گرم) بدست آمد. بیشترین مقدار استیگمااسترول در روغن ذرت (٦٦ میلی‌گرم/۱۰۰ گرم) و از بذرها در آفتابگردان (۲۹ میلی‌گرم/۱۰۰ گرم) و کمترین مقدار آن در روغن گردو و مغز آن (۰ میلی‌گرم/۱۰۰ گرم) برآورد شد. بیشترین مقدار بتا-سیتواسترول در روغن ذرت (۵۸٦ میلی‌گرم/۱۰۰ گرم) و بذر کنجد (۲٦۳ میلی گرم/۱۰۰ گرم) و کمترین مقدار آن به‌ترتیب در روغن خرما و میوه نارگیل با ۲٤ و ۳۹ میلی‌گرم/۱۰۰ گرم سنجش شد. روغن ذرت با ۲۸ میلی‌گرم/۱۰۰ گرم و روغن های کتان، زیتون، خرما و کنجد با ۰ میلی گرم/۱۰۰ گرم بیشترین و کمترین مقدار بتا-سیتواستانول را در بین روغن‌های مورد مطالعه داشتند. در بین مغزها و بذرها نیز بیشترین مقدار بتا-سیتواستانول در کدو تنبل با ۳۹/٤ میلی‌گرم/ ۱۰۰گرم بدست آمد و میوه نارگیل، کنجد، پسته و گردو (۰ میلی گرم/۱۰۰ گرم) فاقد این استرول بودند (Normén *et al*., 2007). بررسی مقدار و انواع فیتواسترول ها و فیتواستانول‌ها در روغن سه بخش دانه ذرت (ژرم، پری‌کارپ و آندوسپرم) نشان داد که از فیتواستانول‌ها، بتا-سیتواستانول (٪۸۷-۷۷) و کمپستانول (٪۲۳-۱۳) و از فیتواسترول‌ها، بتا-سیتواسترول (٪٦۹-٦۲)، کمپسترول (٪۱۸-۱۱) و استیگمااسترول (٪۱۳-۵) فراوانترین استرول‌ها را تشکیل می‌دهند (Harrabi *et al*., 2008).

امروزه فیتواسترول ها کاربردهای متعددی در صنایع داروسازی (تولید استروئیدهای دارویی)، غذایی (افزودنی‌های پادکلسترول در غذا) و در صنایع آرایشی (کرم‌ها) دارند (Fernandez & Cabral, 2007). آنها دارای خواص پادسرطانی، پاداکسیدانی، پادباکتریایی و ترمیم‌کننده زخم می‌باشند. همچنین آنها در کاهش کلسترول خون و خطر بیماریهای قلبی-عروقی نیز مؤثر هستند (Fassbender *et al*., 2008؛ Li *et al*., 2007؛ Jain *et al*., 2008). فیتواسترول‌ها در درمان بیماریهای پوستی مزمن مانند اگزما و دیابت نیز مفید می‌باشند (Tanaka *et al*., 2006). در صنعت فیتواسترول‌ها به‌عنوان یک ماده امولسیون‌کننده فعال زیستی کاربرد دارند (Sokirka *et al*., 1987). گزارش‌ها در رابطه با بررسی فیتواسترول ها در تیره گل گل‌گاوزبان (Boraginacaea) بسیار اندک می‌باشد. Wretenjo و Karlberg (۲۰۰۲) با روش GC-MS وجود استرول‌هایی مانند کمپسترول، سیتواسترول، ایزوفوکواسترول (isofucosterol)،

سیترواستادینول (citrostadienol) و گرامی‌استرول (gramisterol) را در روغن گل‌گاوزبان اروپایی (*Borago officinalis*) نشان دادند.

در ایران چهار گونه از جنس گل گاوزبان متعلق به تیره گل گل‌گاوزبان به نام‌های گل‌گاوزبان ایرانی (*E. amoenum*)، گل‌گاوزبان ایتالیایی (*E. italicum*)، گل‌گاوزبان قرمز یا روسی (*E. russicum*) و گل‌گاوزبان خوزستانی (*E. khozistanicum*) به‌صورت خودرو می‌رویند. این گونه‌ها بیشتر در نواحی شمالی و غربی ایران پراکنش دارند (Riedl, 1967). با توجه به این‌که تعداد گزارش‌ها در رابطه با وجود فیتواسترول‌ها در گونه‌های تیره گل‌گاوزبان اندک می‌باشد، بنابراین درخصوص وجود این ترکیب‌ها در گونه‌های گل‌گاوزبان ایران به‌ویژه انواع بومی تاکنون بررسی انجام نشده‌است؛ هدف اصلی پژوهش حاضر مطالعه کمّی و کیفی فیتواسترول‌ها در بذر برخی جمعیت‌های خودرو ۲ گونه گل‌گاوزبان ایران در نظر گرفته شد.

مواد و روشها

جمع‌آوری نمونه‌ها

بذرهای کاملاً رسیده و بالغ ٦ جمعیت از ۲ گونه گل‌گاوزبان ایرانی (*E. amoenum* Fisch & C.A.) و گل‌گاوزبان ایتالیایی (*E. italicum* L.) از رویشگاه‌های طبیعی آنها در شهریورماه ۱۳۸۷ از ٦ منطقه متفاوت جمع آوری شدند. ویژگی‌های جغرافیایی زیستگاه‌های نمونه‌های مورد مطالعه در جدول ۱ آورده شده‌است. نمونه‌های هرباریومی گونه‌های جمع‌آوری شده در هرباریوم مرکزی دانشگاه تهران نگهداری می‌شوند.

بذرها پس از جمع آوری با استفاده از دستگاه فریز درایر (Snijders Scientific Freeze Dryer, Germany) و در خلأ کمتر از ۱ بار و فشار کمتر از ۰/۰۰۱ اتمسفر، به‌طور کامل آب‌گیری شده و بعد با آسیاب به طور کامل پودر شدند و تا زمان استفاده در دمای ۲۰°C- نگهداری شدند.

بررسی کیفی فیتواسترول‌ها به روش TLC

از هر نمونه پودر بذر، ۰/۵ گرم وزن و با استفاده از حلال کلروفرم عصاره‌گیری از آن انجام شد. برای بررسی کیفی فیتواسترول‌ها در عصاره‌ها از روش کروماتوگرافی لایه نازک استفاده شد. برای این منظور از صفحات ۲۰cm × ۲۰ از پیش آماده و فعال شده آلومینیومی و پوشیده شده با سیلیکاژل ٦۰(Merck) G به‌عنوان فاز ثابت استفاده شد. از اتیل استات و پترولیوم بنزن (۱۵: ۸۵) به‌عنوان فاز متحرک برای تفکیک اجزای استرولی عصاره‌ها استفاده شد. حجم ۱۰ میکرولیتر از هر یک از عصاره‌ها و ۵ میکرولیتر از نمونه‌های استاندارد استیگما استرول (شرکت سیگما-آلدریچ)، بتا-سیتواسترول (شرکت سیگما-آلدریچ) و کلسترول (شرکت مرک) به صورت نواری بر روی صفحه TLC لکه‌گذاری شدند. پس از پیشروی فاز حلال تا ارتفاع ۱۰cm، صفحه‌ها از تانک کروماتوگرافی خارج و با معرف سولفوریک اسید ۹۷٪ و متانول (۱:۱) افشانه شدند. سپس صفحه‌ها برای آشکارسازی نوارها در آون ۱۰۰ °C به مدت ۱۵ دقیقه حرارت داده شدند. رنگ و Rf نوارها در نور مرئی بررسی و با فیتواسترول های استاندارد مقایسه شد.

سنجش فیتواسترول تام به روش طیف‌سنجی نوری

پودر بذر (۰/۵ گرم) هر یک از نمونه های مورد مطالعه با کلروفرم عصاره‌گیری شد و بعد به هر یک ۲ میلی‌لیتر معرف لیبرمن بورشارد اضافه گردید و پس از ۱۵ دقیقه

نگهداری در تاریکی، جذب عصاره ها با دستگاه طیف‌سنج نوری (UV-Vis Shimadzu spectrophotometer, UV-1601PC) در طول موج ٦٤٠ نانومتر اندازه‌گیری شد. این معرف با استرول‌ها واکنش داده و رنگ سبز درخشانی را ایجاد می‌کند (Sabir *et al.*, 2003). از هر نمونه بذر ۳ بار عصاره‌گیری انجام شد. برای تعیین مقدار فیتواسترول تام در نمونه‌ها محلول‌هایی با غلظت‌های ۰، ۰/۲، ۰/٤، ۰/٦، ۰/۸، ۱/۰، ۱/۲ و ۱/٤ میلی‌گرم در لیتر استیگمااسترول استاندارد تهیه شد و پس از اندازه‌گیری میزان جذب آنها در طول موج ٦٤٠ نانومتر منحنی استانداردی رسم شد (شکل ۲). با استفاده از معادله بدست آمده از منحنی استاندارد، درصد فیتواسترول تام (وزن خشک) هر یک از نمونه‌های بذر محاسبه شد.

بررسی فیتواسترول‌ها به روش GC

آماده‌سازی نمونه‌ها برای استخراج فیتواسترول‌های همیوغ

حدود ۰/۵ گرم از پودر بذر هر نمونه همراه با ۲۰۰ میکروگرم کلسترول (استاندارد داخلی) با ۱۰ میلی‌لیتر هیدروکلریک اسید ٤ مولار مخلوط و به مدت ۱ ساعت در دمای ۸۰°C با استفاده از خنک‌کننده، رفلکس شد. به مخلوط حاصل پس از سرد شدن در دمای اتاق، ۵ میلی‌لیتر محلول پتاسیم هیدروکسید اتانولی ٤ مولار افزوده شد و دوباره در دمای ۷۰°C به مدت ۱ ساعت رفلکس گردید و پس از سرد شدن در دمای اتاق ۱۰ میلی‌لیتر هگزان و ۵ میلی‌لیتر آب بدون یون و مقدار کمی پتاسیم کلرید به آن افزوده شد. مخلوط حاصل به مدت ۵ دقیقه با کمک دستگاه فراصوت، به‌طور کامل همگن شد و پس از آن به قیف جداکننده ۱۲۵ میلی‌لیتری منتقل و لایه رویی هگزان جمع‌آوری شد. در مرحله بعد لایه هگزان، ۳ مرتبه با ۳ میلی‌لیتر محلول آبی پتاسیم هیدروکسید ۰/۲۵ مولار شستشو شد و هر بار لایه رویی هگزان جداسازی و pH آن با استفاده از آب بدون یون روی ٦ تنظیم شد. سپس عصاره حاصل به یک بالن انتقال داده شد و مقداری پتاسیم سولفات بدون آب برای آب‌گیری به آن افزوده شد. در نهایت با استفاده از دستگاه تقطیر در خلأ حجم محلول هگزان به ۱ میلی‌لیتر رسانده شد و با استفاده از گاز نیتروژن، حلال هگزان به طور کامل تبخیر شد و نمونه برای مشتق‌سازی آماده گردید (Liu *et al.*, 2007).

آماده‌سازی نمونه‌ها برای استخراج فیتواسترول‌های آزاد

به ۱ گرم از پودر بذر هر نمونه ۲۰ میلی‌لیتر دی‌کلرومتان افزوده شد و مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه با کمک دستگاه فراصوت همگن گردید. مخلوط حاصل به مدت نیم ساعت در دمای اتاق به حالت سکون نگهداری شد و با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره ۱، صاف گردید و بعد با استفاده از دستگاه تبخیر در خلأ و گاز نیتروژن، حلال به طور کامل خشک و نمونه مورد نظر برای مشتق‌سازی آماده شد (Liu *et al.*, 2007).

مشتق‌سازی فیتواسترول‌های آزاد و همیوغ در نمونه‌ها

پس از استخراج فیتواسترول‌های آزاد و همیوغ از نمونه‌های بذر، نمونه‌ها برای آنالیز با دستگاه GC طبق روش زیر مشتق‌سازی شدند: بعد از خشک شدن کامل عصاره‌ها با استفاده از گاز نیتروژن، ۵۰ میکرولیتر پیریدین خشک دو بار تقطیر به همراه ۵۰ میکرولیتر معرف BSTFA (N,O-bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide ≥99%) حاوی ۱٪ TMCS (trimethylchlorosilane) (شرکت سیگما-آلدریچ) به آنها افزوده شد و به مدت یک شب در تاریکی و در دمای اتاق نگهداری شدند. سپس هر یک از

عصاره‌ها با ۱ میلی‌لیتر دی‌کلرومتان رقیق شده و حجم ۱ میکرولیتر از هر یک از آنها برای آنالیز به دستگاه GC تزریق شد (Liu *et al.*, 2007). استخراج و مشتق‌سازی از هر نمونه ۳ بار انجام شد.

شناسایی و سنجش فیتواسترول‌ها به روش GC

برای شناسایی و جداسازی انواع استرول‌ها در عصاره‌ها از دستگاه گاز کروماتوگراف CP-3800 (شرکت Varian، هلند) متصل به آشکارساز FID و مجهز به ستون مویین سیلیکای (CP-Sil 5 CB WCOT) (طول ستون: ۱۵ متر، قطر داخلی: ۰/۲۵ میلی‌متر، ضخامت فیلم: ۰/۲۵ میکرومتر) استفاده شد. هلیم با فشار psi ٦ در ستون به عنوان گاز حامل بکار رفت. نسبت شکاف در اتاقک تزریق ۲۰:۱ بود، برنامه حرارتی ستون با دمای ۱۵۰°C به مدت ۲ دقیقه آغاز شد و پس از آن با افزایش دمای ۵°C در دقیقه به دمای ۳۰۰°C رسید و بعد به مدت ۱۵ دقیقه در همین دما باقی ماند. دمای اتاقک تزریق ۳۰۰°C، دمای آشکارساز ۳۰۰°C و حجم عصاره برای تزریق ۱ میکرولیتر بود. شناسایی اجزای موجود در کروماتوگرام‌ها به کمک زمان بازداری آنها انجام شد. زمان بازداری اجزای مختلف با استفاده از داده‌های تزریق فیتواسترول‌های استاندارد (کمپسترول، استیگمااسترول، بتاسیتواسترول و بتا-سیتواستانول) (شرکت سیگما-آلدریچ)، در شرایط یکسان با تزریق نمونه‌ها محاسبه گردید و از کلسترول به عنوان استاندارد داخلی برای سنجش‌های کمّی استفاده شد.

آنالیز آماری داده‌ها

داده‌ها با کمک نرم‌افزار SPSS (version 16) و برنامه آماری ANOVA یک‌طرفه مورد پردازش قرار گرفتند و میانگین‌ها با کمک آزمون دانکن گروه‌بندی و مقایسه شدند.

نتایج

نتایج حاصل از بررسی کمّی و کیفی فیتواسترول‌ها

نتایج بررسی کیفی فیتواسترول‌ها به روش TLC

نتایج حاصل از TLC عصاره‌های کلروفرمی بذر نمونه های مورد مطالعه وجود فیتواسترول ها را در آنها مورد تأیید قرار دادند. TLC کروماتوگرام حاصل وجود دو فیتواسترول، استیگمااسترول و بتا-سیتواسترول را با Rf نزدیک ۰/۲ و ۰/۲۵ در نمونه های مورد بررسی نشان داد. به‌دلیل تشابه ساختمانی فیتواسترول ها، استفاده از نسبت های مختلف حلال‌ها به‌عنوان فاز متحرک نتوانست سبب تغییر بیشتر Rf نمونه ها و تفکیک بهتر آنها شود، اما متفاوت بودن رنگ نوار نمونه‌های استاندارد به تشخیص فیتواسترول‌ها کمک نمود. رنگ نوار استیگمااسترول در نور مرئی پس از افشانه کردن معرف، سبز و نوار حاوی بتا-سیتواسترول صورتی بود. عدم مشاهده لکه ارغوانی در کروماتوگرام عصاره ها نشان‌دهنده نبود کلسترول در آنها بود.

نتایج سنجش فیتواسترول تام به روش طیف‌سنجی نوری

همان‌گونه که در جدول ۲ مشخص می‌باشد، مقدار فیتواسترول تام (در یک گرم وزن خشک) در بذر گل گاوزبان های رویش یافته در مناطق جغرافیایی مختلف تفاوت به طور کامل معنی داری ($p < ۰/۰۵$) نشان دادند. بیشترین مقدار فیتواسترول تام، ۰/۱٦ ± ۱/۹۹ میلی‌گرم/گرم وزن خشک در بذر گل‌گاوزبان ایرانی جمعیت جنت رودبار رامسر و کمترین مقدار در بذر گل گاوزبان ایتالیایی جمعیت الموت قزوین به میزان ۰/۰۱۷ ± ۰/۱۹ میلی‌گرم/گرم وزن خشک برآورد شد.

نتایج شناسایی و سنجش فیتواسترول‌ها به روش GC

فیتواسترول‌های آزاد و همیوغ از بذرهای ٦ جمعیت از ۲ گونه گل‌گاوزبان ایران استخراج و مقدار و نوع آنها به روش GC مورد بررسی قرار گرفت (جدول‌های ۳ و ٤). کمپسترول، استیگمااسترول، بتا-سیتواسترول و بتا-سیتواستانول به‌ترتیب با زمان‌های بازداری ۳۲/۸٦، ۳۳/۲۲، ۳٤/۱٦ و ۳٤/۳۵ دقیقه، مهمترین فیتواسترول های شناسایی شده در گاز کروماتوگرام‌های حاصل بودند. کمترین و بیشترین مقدار فیتواسترول تام در بذر نمونه‌های مختلف، از ۱۱۲ میلی گرم/۱۰۰ گرم وزن خشک در جمعیت هزار جریب از گونه گل‌گاوزبان ایرانی تا ۳۹۹/٤ میلی‌گرم/۱۰۰ گرم وزن خشک در جمعیت الموت قزوین گونه گل گاوزبان ایتالیایی متغیر بود. تفاوت بین میانگین‌ها در سطح اختلاف کمتر از ۵٪ معنی‌دار بود. بیشترین مقدار بتا-سیتواستانول تام (آزاد + همیوغ) (۱٤۱/٤ میلی‌گرم/۱۰۰ گرم زن خشک) و کمپسترول تام (۲۱۲ میلی‌گرم/ ۱۰۰ گرم وزن خشک) در بذر گل‌گاوزبان ایتالیایی جمعیت الموت قزوین برآورد شد و بذرهای جمعیت بهشهر از گونه گل گاوزبان ایرانی و جمعیت کلیبر از گونه گل‌گاوزبان ایتالیایی با ۱٤۱ و ٤ میلی‌گرم/۱۰۰ گرم وزن خشک به‌ترتیب بیشترین مقدار بتا-سیتواسترول تام و استیگمااسترول تام را دارا بودند. همچنین نتایج نشان داد که در بین نمونه‌های مورد مطالعه، بذر جمعیت‌های بومهن و الموت قزوین از گونه گل‌گاوزبان ایتالیایی به‌ترتیب بیشترین محتوای فیتواسترول آزاد (۱۲۲ میلی گرم /۱۰۰ گرم وزن خشک) و فیتواسترول همیوغ (۳۳۱/٤ میلی‌گرم/ ۱۰۰ گرم وزن خشک) را دارا می‌باشند.

مقدار کمپسترول تام نسبت به فیتواسترول تام بذر از ۲۲/۸۹٪ در جمعیت جنت رودبار رامسر از گونه گل‌گاوزبان ایرانی تا ۵۳/۱۳٪ در جمعیت الموت قزوین از گل‌گاوزبان ایتالیایی برآورد شد. استیگمااسترول چه به‌صورت آزاد و چه به‌صورت همیوغ در بیشتر نمونه‌ها وجود نداشت و مقدار استیگمااسترول تام نسبت به فیتواسترول تام در بذر ۲ جمعیت بهشهر از گونه گل‌گاوزبان ایرانی و کلیبر از گونه گل‌گاوزبان ایتالیایی به‌ترتیب ۰/۸۰٪ و ۲/۵٦٪ سنجش شد. بتا-سیتواسترول از فیتواسترول‌های شاخص موجود در بذر نمونه‌ها بود که مقدار آن نسبت به فیتواسترول تام از ۱۱/۵۳٪ در گل‌گاوزبان ایتالیایی جمعیت الموت قزوین تا ۵٦/٤۰٪ در گل‌گاوزبان ایرانی جمعیت بهشهر متغیر بود. بتا-سیتواستانول از فیتواسترول‌های مهم دیگری بود که در تمام نمونه‌های بذر وجود داشت و مقدار آن از ۲۰/٤۰٪ محتوای فیتواسترول تام در جمعیت بهشهر از گونه گل‌گاوزبان ایرانی تا ۳۵/٤٤٪ در جمعیت الموت قزوین از گل‌گاوزبان ایتالیایی تغییر می‌کرد.

جدول ۱- ویژگی‌های اکولوژیکی مناطق جمع‌آوری گیاهان مورد مطالعه و شماره هرباریومی نمونه‌ها در هرباریوم مرکزی دانشگاه تهران

شماره هرباریومی	موقعیت جغرافیایی	گونه (جمعیت)
۳۸۸۹۱	بومهن، استان تهران، ۳۵ کیلومتری شهرستان تهران، کوهپایه، آب و هوای سرد و نیمه‌مرطوب، ارتفاع از سطح دریا ۱۷۱۱ متر و متوسط بارندگی سالیانه ۳۰۵ میلی‌متر	*E. italicum* (بومهن)
۳۸۸۹۲	کلیبر در استان آذربایجان شرقی، ۵ کیلومتری قصر بابک، آب و هوای معتدل کوهستانی، ارتفاع از سطح دریا ۱۷۱۰ متر و متوسط بارندگی سالیانه ۳۳۰ میلی‌متر	*E. italicum* (کلیبر)
۳۸۸۹۳	الموت قزوین، استان قزوین، ٤۵ کیلومتری قزوین به سوی دریاچه اوان، آب و هوای کوهستانی و سرد، ارتفاع از سطح دریا ۱۳۰۰ متر و متوسط بارندگی سالیانه ۳۰۰-۲۰۰ میلی‌متر	*E. italicum* (الموت قزوین)
۳۸۸۹٤	هزارجریب، استان مازندران، ۸۰ کیلومتری جنوب شهرستان بهشهر، از جنوب و شرق به‌ترتیب به استان‌های سمنان و گلستان و از غرب به ارتفاعات شهرستان نکا محدود می‌شود، آب وهوای معتدل کوهستانی، ارتفاع از سطح دریا ۲۸۰۰-۲۰۰۰ متر و متوسط بارندگی سالیانه ۳۸۳ میلی‌متر	*E. amoenum* (هزارجریب)
۳۸۸۹۵	شهرستان بهشهر در شرق استان مازندران، آب و هوای معتدل و مرطوب، ارتفاع از سطح دریا ۳۰۰-۳۰ متر و متوسط بارندگی سالیانه ٦۵۱/۹ میلی‌متر	*E. amoenum* (بهشهر)
۳۸۸۹٦	شهرستان رامسر در غرب استان مازندران، ٤۵ کیلومتری جنت رودبار به تنکابن بعد از منطقه حفاظت‌شده بیا و سیبون، آب و هوای معتدل و مرطوب، ارتفاع از سطح دریا ۱۲۵۰ متر و متوسط بارندگی سالیانه ۱۳۰۰ میلی‌متر	*E. amoenum* (جنت رودبار)

جدول ۲- مقایسه مقدار فیتواسترول تام در بذرهای ٦ جمعیت از ۲ گونه گل‌گاوزبان ایران به روش طیف‌سنجی نوری

(جمعیت) گونه	فیتواسترول تام (میلی‌گرم/گرم وزن خشک)
E. italicum (بومهن)	۱/۵۵ ± ۰/۱٤ b
E. italicum (کلیبر)	۰/٤۰ ± ۰/۰٦٦ d
E. italicum (الموت قزوین)	۰/۱۹ ± ۰/۰۱۷ d
E. amoenum (هزار جریب)	۰/۸۸ ± ۰/۰٦٤ c
E. amoenum (بهشهر)	۱/۷۳ ± ۰/۰۰۹ b
E. amoenum (جنت رودبار)	۱/۹۹ ± ۰/۱٦ a

داده‌ها به‌صورت میانگین‌ها ± انحراف معیار نمایش داده شده‌اند. حروف a، b، c، d نشان‌دهنده معنی‌دار بودن تفاوت میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح $p < ۰/۰۵$ می‌باشند.

دار فیتواسترول تام و فیتواسترول‌های آزاد و همیوغ (میلی‌گرم/۱۰۰ گرم وزن خشک) در بذرهای ٦ جمعیت از ۲ گونه گل‌گاوزبان ایران به روش GC

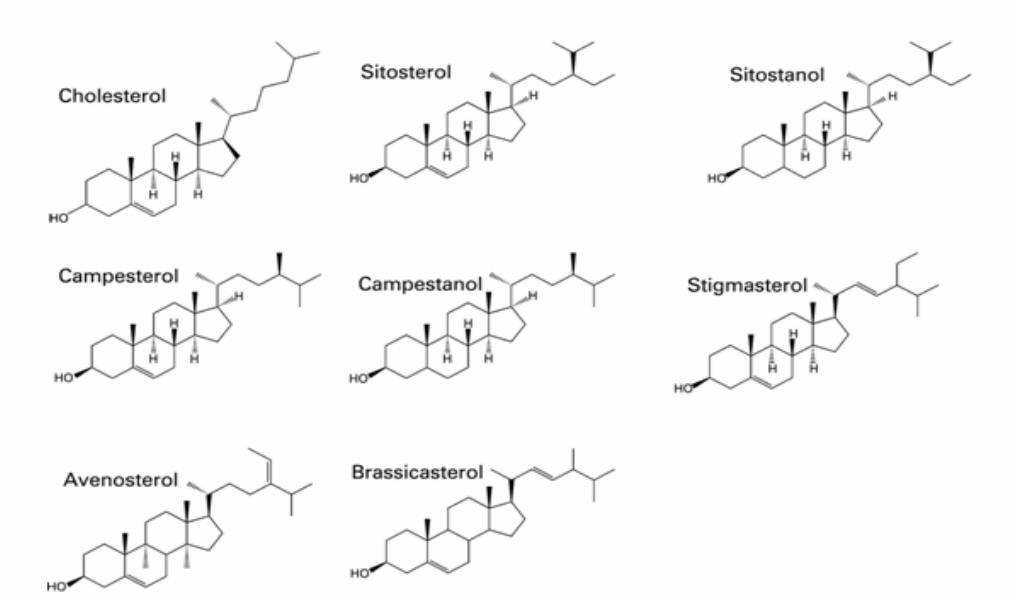
(جمعیت) گونه	فیتواسترول تام (میلی‌گرم/۱۰۰ گرم وزن خشک)					فیتواسترول آزاد (میلی‌گرم/۱۰۰ گرم وزن خشک)						
	تام	سیتواستانول	سیتواسترول	استیگما استرول	کمپسترول	تام	سیتواستانول	سیتواسترول	استیگما استرول	کمپسترول	تام	ل
E. italicum (بومهن)	۲۳٤ b	۲۸	۱۳۰	–	۷٦	۱۲۲	۱٦ ± ۰/۰۹	٦۸ ± ۰/۹٦	–	۳۸ ± ۱/۵۸	۱۱۲	۱
E. italicum (کلیبر)	۱۵٦ c	۲۳	۸۱	٤	٤۸	٤٦	۵ ± ۰/۰۲	۲۵ ± ۰/۸۳	۲ ± ۰/۰۸	۱٤ ± ۰/۲۹	۱۱۰	۱/
E. italicum (الموت قزوین)	۳۹۹/٤ a	۱٤۱/٤	٤٦	–	۲۱۲	٦۸	۳٦ ± ۰/۱٦	۱۰ ± ۰/۲۹	–	۲۲ ± ۰/۱٦	۳۳۱/٤	۱۰۵
E. amoenum (هزارجریب)	۱۱۲ d	۲۳	۵۹	–	۳۰	۵۰	۹ ± ۰/۰۷	۲۷ ± ۰/۱۷	–	۱٤ ± ۰/۱۸	٦۲	۱
E. amoenum (بهشهر)	۲۵۰ b	۵۱	۱٤۱	۲	۵٦	۱۱۱	۱۸ ± ۱/۱۵	۷۰ ± ۰/۸۷	–	۲۳ ± ۰/۱۳	۱۳۹	۳
E. amoenum (جنت رودبار)	۱۷٤ c	۱۹	۱۰۹	–	٤٦	۷۳	۱٦ ± ۱/۲۷	۳۷ ± ۰/۹۱	–	۲۰ ± ۰/٤۱	۱۰۱	۳

ش داده شده‌اند. حروف a، b، c و d نشان‌دهنده معنی‌دار بودن تفاوت میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح $p < ۰/۰۵$ می‌باشند.

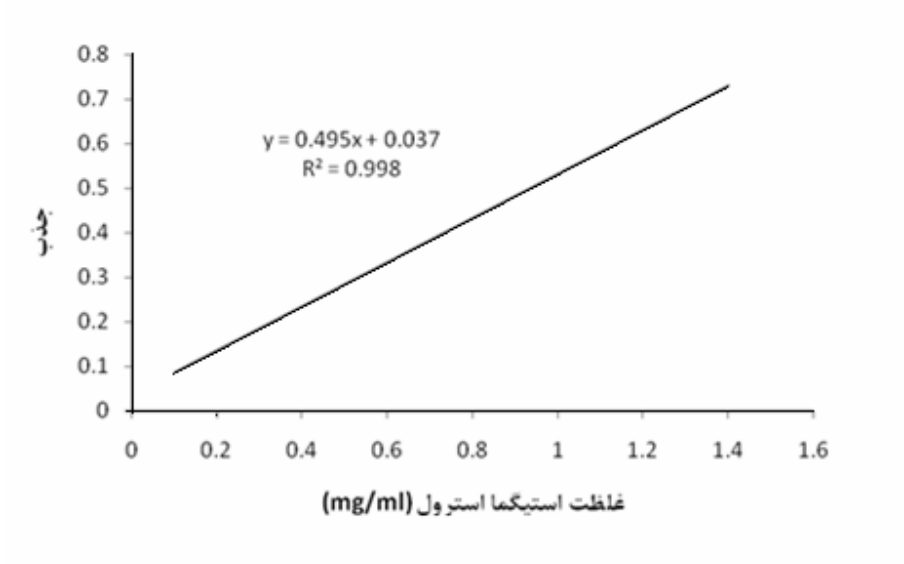
حاصل از سنجش مقدار فیتواسترول تام و فیتواسترول‌های آزاد و همیوغ (٪) نسبت به فیتواسترول تام (میلی‌گرم/گرم وزن خشک) در بذرهای ٦ جمعیت از ۲ گونه گل‌گاوزبان ایران به روشGC

(جمعیت) گونه	فیتواسترول تام (٪)				فیتواسترول آزاد (٪)				ول همیوغ (٪)	
	سیتواستانول	سیتواسترول	استیگمااسترول	کمپسترول	سیتواستانول	سیتواسترول	استیگمااسترول	کمپسترول	سیتواستانول	سیتواسترول	ل
E. italicum (بومهن)	۱۱/۹۷	۵۵/٦۰	–	۳۲/٤۸	٦/۸٤	۲۹/۱۰	–	۱٦/۲٤	۵/۱۳	۲٦/۵۰	
E. italicum (کلیبر)	۱٤/۷۵	۵۱/۹۳	۲/۵٦	۳۰/۷٦	۳/۲۱	۱٦/۰۳	۱/۲۸	۸/۹۷	۱۱/۵٤	۳۵/۹۰	
E. italicum (الموت قزوین)	۳۵/٤٤	۱۱/۵۳	–	۵۳/۱۳	۹/۰۲	۲/۵۱	–	۵/۵۱	۲٦/٤۲	۹/۰۲	
E. amoenum (هزارجریب)	۲۰/۵٤	۵۲/٦۸	–	۲٦/۷۹	۱۲/۵۰	۲۸/۵۷	–	۱٤/۲۹	۸/۰٤	۲٤/۱۱	
E. amoenum (بهشهر)	۲۰/٤۰	۵٦/٤۰	۰/۸۰	٤۵/۲۹	۷/۲۰	۲۸/۰۰	–	۹/۲۰	۱۳/۲۰	۲۸/٤۰	
E. amoenum (جنت رودبار)	۲۲/۸۹	۵٤/۲۳	–	۲۲/۸۹	۷/۹٦	۱۸/٤۱	–	۹/۹۵	۱٤/۹۳	۳۵/۸۲	

ش داده شده‌اند. حروف a، b، c و d نشان‌دهنده معنی‌دار بودن تفاوت میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح $p < ۰/۰۵$ می‌باشند.



شکل ۱- مقایسه ساختار فیتواسترول‌ها و فیتواستانول‌های متداول در روغن‌های گیاهی با کلسترول (Kidambi & Patel, 2008).



شکل ۲- منحنی استاندارد استیگمااسترول

بحث

همان‌گونه که در بخش نتایج آورده شده‌است تفاوت معنی‌داری بین مقدار فیتواسترول تام برآورد شده با هر دو روش طیف‌سنجی نوری و GC در بذرهای گیاهان مورد مطالعه هم در سطح بین‌گونه‌ای و هم در سطح بین جمعیتی مشاهده شد. این امر می‌تواند ناشی از تفاوت‌های ژنتیکی و همچنین ویژگی‌های جغرافیایی و شرایط آب و هوایی رویشگاه‌های آنها باشد. اگرچه تفاوت قابل توجهی بین نتایج سنجش فیتواسترول تام در بذرها در دو روش مشاهده شد، اما این تفاوت در مقدار فیتواسترول تام نمونه‌های بذر دو جمعیت کلیبر و الموت قزوین از گونه گل‌گاوزبان ایتالیایی بیشتر قابل مشاهده بود. با توجه به داده‌ها در جدول‌های ۳ و ٤ می‌توان دریافت که در بذر دو نمونه ذکر شده مقدار و نسبت فیتواسترول‌های همیوغ به فیتواسترول‌های آزاد در آنها بسیار بیشتر است. با توجه به این مسئله به‌نظر می‌رسد که یا حساسیت معرف مورد استفاده در روش طیف‌سنجی تنها نسبت به فیتواسترول‌های آزاد بالا می‌باشد و یا روش مورد استفاده روش مناسبی برای استخراج فیتواسترول‌های همیوغ نمی‌باشد، به همین علت در کل دقت این روش برای سنجش میزان فیتواسترول تام در نمونه‌هایی که مقدار فیتواسترول‌های همیوغ در آنها زیاد می‌باشد، پایین است. با توجه به تفاوت محسوس مشاهده شده بین نتایج در دو روش و خطای بسیار بالای روش طیف‌سنجی برای سنجش فیتواسترول تام در تعدادی از نمونه‌ها، برای ارزیابی دقیق و واقعی میزان این ترکیب‌ها در نمونه‌های گیاهی روش GC بسیار مناسبتر به‌نظر می‌رسد.

نتایج کمّی حاصل از روش GC نشان داد که مقدار استرول تام (۱۱۲–۳۹۹/٤ میلی‌گرم/۱۰۰ گرم وزن خشک) در بذر گیاهان گل‌گاوزبان مورد مطالعه در پژوهش حاضر بسیار بیشتر از مقادیر گزارش شده (٤٤/۷–۹۵/۵ میلی‌گرم/۱۰۰ گرم وزن خشک) در غلاتی مانند جو، جو دوسر، چاودار و گندم، و مغزهایی مانند گردو، فندق، بادام و بادام‌زمینی (۹۹/۱۲–۲۰۷/۱۷ میلی‌گرم/۱۰۰ گرم وزن روغن) می‌باشد؛ به‌طوری که میانگین فیتواسترول تام (۳٤۸ میلی‌گرم/۱۰۰ گرم) در روغن‌های گیاهی مانند زیتون، کنجد، خرما، کلزا، ذرت، آفتابگردان و کتان قابل مقایسه با منابع غنی از فیتواسترول مانند کنجد و ژرم گندم (٤۰۰–٤۱۳ میلی‌گرم/۱۰۰ گرم وزن خشک) می‌باشد (Normén *et al.*, 2007؛ Harrabi *et al.*, 2008). بیشترین مقدار بتا–سیتواسترول تام (۱٤۱میلی‌گرم/۱۰۰ گرم وزن خشک) سنجش شده در بذر گیاهان گل‌گاوزبان نیز بسیار بیشتر از مقدار آن در روغن خرما (۲٤ میلی‌گرم/۱۰۰ گرم و میوه نارگیل (۳۹ میلی‌گرم/۱۰۰ گرم) (Normén *et al.*, 2007) و قابل مقایسه با مقدار گزارش شده برای سویا (۱۱۸ میلی‌گرم/۱۰۰ گرم وزن خشک) (Lagarda *et al.*, 2006) می‌باشد. با توجه به آن‌که بتا–سیتواسترول فیتواسترول غالب در غلات، مغزها (Lagarda *et al.*, 2006) و بخش‌های مختلف دانه ذرت (٦۹–٦۲٪) (Harrabi *et al.*, 2008) می‌باشد، در اغلب جمعیت‌های گل‌گاوزبان مورد مطالعه این استرول بیش از ۵۰٪ محتوای فیتواسترول تام بذر را تشکیل می‌داد. بذر گل‌گاوزبان ایرانی جمعیت بهشهر، با مقدار ۵٦/٤۰٪ بتا–سیتواسترول تام (آزاد + همیوغ)، غنی‌ترین منبع از نظر این استرول بود. کمپسترول نیز در تمام نمونه‌ها، مقدار بیشتر از ۲۰٪ فیتواسترول تام را تشکیل می‌داد و در بذر دو جمعیت

بهشهر از گونه گل‌گاوزبان ایرانی و الموت قزوین از گونه گل‌گاوزبان ایتالیایی مقدار آن به بیش از ٤٠٪ فیتواسترول تام نیز رسید. مقایسه بیشترین مقدار کمپسترول تام (۲۱۲ میلی‌گرم/۱۰۰ گرم) در بذر گیاهان گل‌گاوزبان با مقادیر آن در روغن‌های غنی از این استرول مانند روغن کلزا (۲۷۹ میلی‌گرم/۱۰۰ گرم) و بذرهایی مانند کنجد (۷۰ میلی‌گرم/۱۰۰ گرم) (Normén *et al*., 2007) و همچنین درصد بالای این فیتواسترول در بذر این گیاهان نسبت به روغن دانه ذرت (۱۸–۱۱٪) (Harrabi *et al*., 2008) و غلات (۲۱٪) (Lagarda *et al*., 2006)، نشان می‌دهد که بذرهای گیاهان گل‌گاوزبان می‌توانند منابع غنی از این فیتواسترول برای مصارف صنعتی و دارویی باشند. بذر گل‌گاوزبان ایتالیایی جمعیت الموت قزوین با بیشترین مقدار بتا–سیتواستانول (١٤١/٤ میلی‌گرم/۱۰۰ گرم)، دارای ارزشی بسیار بیشتر از روغن‌ها و مغزهایی مانند روغن ذرت (۲۸ میلی‌گرم/۱۰۰ گرم) و کدو تنبل (٣٩/٤ میلی‌گرم/۱۰۰ گرم) (Normén *et al*., 2007) و قابل مقایسه با منابع غنی از این استرول مانند دانه ذرت (Harrabi *et al*., 2008) می‌باشد. روغن حاصل از بخش‌های مختلف دانه ذرت با ۸۷–۷۷٪ و روغن ژرم گندم با ٥٥/٣٪ بتا–سیتواستانول از منابع غذایی غنی این استرول دارویی هستند (Harrabi *et al*., 2008)، در صورتی‌که وجود مقدار کمی (٤٪) از این استرول در غلات گزارش شده است (Lagarda *et al*., 2006). لازم به یادآوریست که برخی از منابع عمده و پرمصرف غذایی مانند روغن کتان، روغن زیتون، روغن خرما، روغن کنجد، میوه نارگیل، کنجد و پسته فاقد این فیتواستانول با ارزش می‌باشند (Normén *et al*., 2007). در بررسی‌های انجام شده توسط Perez و همکاران (٢٠٠٦) مقدار کمپسترول، بتا–سیتواسترول و استیگمااسترول در نیشکر به‌ترتیب ۲۵٪، ٤٢٪ و ۳۳٪ استرول تام گزارش شده‌است. در سویا، استیگمااسترول ۲۵٪ و بتا–سیتواسترول ۷۰٪ استرول تام را تشکیل می‌دهند و حدود ٥٪ نیز فیتواسترول‌های دیگر گزارش شده‌است. در مطالعه‌ای دیگر بر روی سویا، مقدار بتا–سیتواسترول ٤٨٪، استیگمااسترول ۲۱٪، کمپسترول ۲۷٪ و ٥/٩٪ استرول‌های دیگر گزارش شده‌است (Matvienko *et al*., 2002). مقدار استیگمااسترول در روغن بخش‌های مختلف دانه ذرت ۱۳–٥٪ (Harrabi *et al*., 2008)، در غلات به‌طور میانگین ٤٪ و مقادیر کمی نیز در مغزها (Lagarda *et al*., 2006) گزارش شده‌است. بذر گیاهان گل‌گاوزبان مورد بررسی از نظر مقدار استیگمااسترول دارای ارزشی برابر یا بیشتر از غلات و مغزهایی مانند گردو، فندق و کدو تنبل می‌باشند (Normén *et al*., 2007). در مقایسه با گیاهانی مانند سویا و نیشکر و همچنین غلات و مغزها که مهمترین منابع غنی غذایی و قابل دسترس استرول‌ها می‌باشند، بذر گیاهان گل‌گاوزبان مورد مطالعه از نظر میزان استرول تام و همچنین محتوای استرول‌های شاخصی مانند کمپسترول، بتا–سیتواسترول و بتا–سیتواستانول قابل توجه بوده و می‌توانند به‌عنوان منابع مکمل این استرول‌ها در صنایع غذایی و دارویی مورد استفاده قرار گیرند. از آنجایی که استرول‌ها اجزای چربی دوست غشاء هستند و برای عملکردهای مختلف سلولی ضروری می‌باشند (Boutte & Grebe, 2009)، بنابراین با معرفی گونه‌های غنی از فیتواسترول گل‌گاوزبان و توصیه به مصرف این گیاهان در رژیم غذایی، می‌توان آنها را به‌عنوان جایگزین مناسبی برای کلسترول مورد توجه قرار داد. از طرف دیگر داروهایی مانند داروهای پروژسترونی، کلیوی، استروژنی و داروهای ضدبارداری، داروهای استروئیدی می‌باشند که از

AD (androsten-dioen-٤) و ADD (1,4-androsta-diene-3,17dione) مشتق می‌شوند. با توجه به این که این داروها از داروهای وارداتی می‌باشند، می‌توان با استخراج استروئیدهایی مانند استیگمااسترول از روغن‌های گیاهی با روشهای بسیار آسان و تبدیل آنها به موادی مانند AD و ADD توسط مایکوباکتریها، به تولید این داروها در صنعت کمک بزرگی نمود. امروزه سویا و نیشکر یکی از منابع عمده فیتواسترول‌ها می‌باشند که در تمام دنیا و به‌طور عمده در آسیا برای مصارف صنعتی بسیار مورد توجه هستند (Perez *et al*., 2006).

نتایج بررسی انواع و مقدار فیتواسترول‌ها در روغن گل‌گاوزبان اروپایی تنها گزارش موجود در رابطه با شناسایی فیتواسترول‌ها در تیره گل‌گاوزبان می‌باشد. نتایج این پژوهش نشان داد که سیتواسترول با ۲۳٪ و کمپسترول با ۳۳٪، اجزای استرولی غالب در روغن گل گل‌گاوزبان اروپایی می‌باشند (Wretenjo & Karlberg, 2002). نتایج پژوهش حاضر در مقایسه با گل‌گاوزبان اروپایی، وجود مقادیر قابل‌توجهی از فیتواسترول‌های مذکور را در بذر تمام جمعیت‌های مختلف گل‌گاوزبان ایران نشان داد. در بین گیاهان گل‌گاوزبان مورد مطالعه در این پژوهش، بذر جمعیت الموت قزوین از گونه گل‌گاوزبان ایتالیایی با ۳۹۹/٤ میلی‌گرم/۱۰۰ گرم وزن خشک استرول تام و ۵۳/۱۳٪ کمپسترول و ۳۵/٤٤٪ بتا-سیتواستانول و بذر جمعیت بهشهر از گونه گل‌گاوزبان ایرانی با ۲۵۰ میلی‌گرم/۱۰۰ گرم وزن خشک استرول تام و ۵٦/٤۰٪ بتا-سیتواسترول شاخص‌ترین نمونه‌ها از نظر کمّیت و کیفیت فیتواسترول‌ها بودند. از آنجایی که در مورد فیتواسترول‌ها در جنس گل‌گاوزبان تاکنون گزارشی ارائه نشده‌است، این اولین گزارش مقایسه‌ای در رابطه با این متابولیت‌های دارویی و صنعتی از نظر کمّیت و کیفیت در گیاهان گل‌گاوزبان (*Echium*) در دنیا می‌باشد.

با توجه به ارزش بسیار بالای فیتواسترول‌ها ازجمله بتا- سیتواسترول و استیگمااسترول در صنعت داروسازی، بذر گونه‌های گل‌گاوزبان ایران می‌توانند منابع مناسبی برای این استرول‌های گیاهی در صنعت داروسازی باشند. بتا-سیتواسترول در بعضی از گیاهان به مقدار کم یافت می‌شود و جزء فیتواسترول‌های نادر می‌باشد که اثر دارویی آن در کاهش کلسترول و پیشگیری از بیماریهای قلبی-عروقی به‌طور کامل تأیید شده‌است (Fernandez & Cabral, 2007؛ Harrabi *et al*., 2008؛ Jain *et al*., 2008).

در حال حاضر گل‌گاوزبان ایرانی به‌دلیل وجود شرایط آب و هوایی به‌طور کامل معتدل و مرطوب در استان‌های شمالی کشور ازجمله مازندران و با اهداف دارویی و غذایی در سطح وسیعی کشت می‌شود. اما تاکنون تلاشی برای بومی‌سازی گل‌گاوزبان ایتالیایی و کشت آن در مقیاس وسیع انجام نشده‌است. با توجه به مقدار زیاد فیتواسترول‌ها در بذر برخی جمعیت‌های این گونه (به‌ویژه جمعیت الموت قزوین) و قابل مقایسه بودن آنها با گل‌گاوزبان ایرانی، پیشنهاد می‌شود که برای بومی‌سازی و کشت این گیاهان در آینده برنامه‌ریزی مناسبی انجام شود.

سپاسگزاری

با تشکر و قدردانی از گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم پایه دانشگاه شاهد که ما را در تأمین امکانات آزمایشگاهی یاری نمودند و با سپاسگزاری از معاونت پژوهشی دانشگاه

شاهد که هزینه‌های مالی پژوهش حاضر را در قالب پژوهانه تأمین نمودند. همچنین نویسندگان این مقاله بر خود لازم می‌دانند تا از سرکار خانم یاسمن سلمکی دانشجوی دکترای سیستماتیک گیاهی دانشگاه تهران که جمع‌آوری برخی نمونه‌ها را بر عهده داشتند و همچنین کارشناسان محترم در پژوهشگاه شیمی و مهندسی شیمی ایران که آنالیز GC نمونه‌ها را انجام دادند، قدردانی نمایند.

منابع مورد استفاده

- Boutte, Y. and Grebe, M., 2009. Cellular processes relying on sterol function in plants. Current Opinion in Plant Biology, 12(6): 705-713.
- Fassbender, K., Lütjohann, D., Dik, M.G., Bremmer, M., König, J., Walter, S., Liu, Y., Letièmbre, M., von Bergmann, K. and Jonker, C., 2008. Moderately elevated plant sterol levels are associated with reduced cardiovascular risk-The LASA study. Atherosclerosis, 196: 283-288.
- Fernandez, P. and Cabral, J.M.S., 2007. Phytosterols: Applications and recovery methods. Bioresource Technology, 98(12): 2335-2350.
- Jain, D., Ebine, N., Jia, X., Kassis, A., Marinangeli, C., Fortin, M., Beech, R., Hicks, K.B., Moreau, R.A., Kubow S. and Jones, P.J.H., 2008. Corn fiber oil and sitostanol decrease cholesterol absorption independently of intestinal sterol transporters in hamsters. Journal of Nutritional Biochemistry, 19(4): 229-236.
- Harrabi, S., St-Amand, A., Sakouhi, F., Sebei, K., Kallel, H., Mayer, P.M. and Boukhchina, S., 2008. Phytostanols and phytosterols distributions in corn kernel. Food Chemistry, 111: 115-120.
- Kidambi, S. and Patel, S.B., 2008. Sitosterolaemia: pathophysiology, clinical presentation and laboratory diagnosis. Journal of Clinical Pathology, 61:588-594.
- Lagarda, M.J., Garc-Llatas, G. and Farr, R., 2006. Analysis of phytosterols in foods. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 41(5): 1486-1496.
- Li, T.S.C., Beveridge, T.H.J. and Drover J.C.G., 2007. Phytosterol content of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) seed oil: extraction and identification. Food Chemistry, 101(4): 1633-1639.
- Liu, W.H., Ding, B., Ruan, X.M., Xu, H.T., Yang, J. and Liu, S.M., 2007. Analysis of free and conjugated phytosterols in tobacco by an improved method using gas chromatography-flame ionization detection. Journal of Chromatography A, 1163(1-2): 304-311.
- Matvienko, O.A., Lewis, D.S., Swanson, M., Arndt, B., Rainwater, D.L., Stewart, J. and Alekel, D.L., 2002. A single daily dose of soybean phytosterols in ground beef decreases serum total cholesterol and LDL cholesterol in young, mildly hypercholesterolemic men. American Journal of Clinical Nutrition, 76(1):57-64.
- Normén, L., Ellegård, L., Brants, H., Dutta, P. and Andersson, H., 2007. A phytosterol database: Fatty foods consumed in Sweden and the Netherlands. Journal of Food Composition and Analysis, 20(3-4): 193-201.
- Perez, C., Falero, A., Luu Duc, H., Balcinde, Y. and Hung, B. R., 2006. A very efficient bioconversion of soybean phytosterols mixtures to androstanes by mycobacteria. Journal of Industrial Microbiology Biotechnology, 33(8): 719-723.
- Riedl, H., 1967. Boraginaceae. Akademische Druck-U. Verlagsanstalt, Graz, Austria, 281p.
- Sabir, S.M., Hayat, I. and Gardezi, S.D.A., 2003. Estimation of sterols in edible fats and oils. Pakistan Journal of Nutrition, 2(3): 178-181.
- Sokirka, V.V., Panina, V.V., Shemeryankin, B.V., Nekrasova, B.V. and Smirnova, V.G., 1987. Methods of synthesis and production technology of drugs: Methods of preparation of β-sitosterol (review). Pharmaceutical Chemistry Journal, 21(9): 666-674.
- Tanaka, M., Misawa, E., Ito, Y., Habara, N., Nomaguchi, K., Yamada, M., Toida, T., Hayasawa, H., Takase, M., Inagaki, M. and Higuchi, R., 2006. Identification of five phytosterols from *Aloe vera* gel as anti-diabetic compounds. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 29(7): 1418-1422.
- Wretenjo, I. and Karlberg, B., 2002. Characterization of sterols in refined Borage oil by GC-MS. Journal of the American Oil Chemists' Society, 79: 1069-1074.

Identification and determination of phytosterols in oilseeds of some populations from two Iranian *Echium* species

S. Abbaszadeh[1], T. Radjabian[2*] and M. Taghizadeh[3]

1- MSc. Student, Department of Biology, Faculty of Science, Shahed University, Tehran, Iran
2*- Corresponding author, Department of Biology, Faculty of Science, Shahed University, Tehran, Iran
E-mail: rajabian@shahed.ac.ir
3- Department of Chemistry, Faculty of Science, Shahed University, Tehran, Iran

Received: May 2011 Revised: June 2011 Accepted: July 2011

Abstract

Phytosterol, a general term applied to a large number of plant-derived sterols, is found exclusively in all organs of higher plants and are often enriched in oilseeds. Phytosterols have wide bioactivity in humans, in particular as an efficacious cholesterol-lowering agent and consequently may have a preventive role against cardiovascular disease and also a variety of cancers. Phytosterols occur in high concentrations in vegetable oils such as the *Echium* (Boraginaceae family). In Iran, four species of *Echium* have been identified so far. In respect of unique roles of phytosterols in human health, the aim of the present study was determination and quantification of sterols in seeds of two Iranian *Echium*. Seeds were collected from six populations of two Iranian *Echium* species (*E. italicum* and *E. amoenum*) from their natural habitats. After extraction with appropriate solvents, the existence of sterols in seeds was characterized by TLC and then their contents were measured using GC and spectrophotometeric methods. Total phytosterol contents were determined using the standard curve equation obtained from the changes in the absorption of solutions at a wavelength of 640 nm. Results from GC analyses showed that total phytosterol contents based on total seed dry weight were also significant, as the highest amount (399/4 mg/100g D.W) was detected in seeds of *E. italicum* (Alamute Qazvin population) and the lowest (112 mg/100g D.W) was measured in seeds of *E. amoenum* species (Hezarjarib population). Also, campesterol (20-50% of total phytosterol) and β-sitosterol (more than 50% of total phytosterol) were the main constituents of the phytosterols in all seeds. Accordingly, seeds of *E.amoenum* (Behshahr population) with 141 mg/100g β-sitosterol and seeds of *E. italicum* (Alamute Qazvin population) with 212 and 141/4 mg/100g campesterol and β-sitostanol were respectively identified as the richest samples.

Key words: *Echium,* Boraginaceae, phytosterol, spectrophotometery, TLC, GC.