

ВЭЖХ-АНАЛИЗ ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА «СИЛИМАР»

¹Росихин Д.В., ¹Куркин В.А., ¹Рыжов В.М., ²Платонов И.А., ²Павлова Л.В.

¹ Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Самара, Россия (443099, Самара, ул. Чапаевская, 89), e-mail: Kurkinvladimir@yandex.ru

² Самарский государственный аэрокосмический университет имени академика С.П. Королева (Национальный исследовательский университет, 443086, Самара, Московское шоссе, 34), e-mail: pia@ssau.ru

В настоящей работе обсуждаются результаты исследований по совершенствованию методов стандартизации лекарственного препарата «Силимар», представляющего собой сумму флаволигнанов (силимарин) плодов расторопши пятнистой [*Silybum marianum* (L.) Gaertn.] и применяемого в качестве гепатопротекторного средства. В результате проведенных исследований разработан метод количественного определения суммы флаволигнанов в лекарственном препарате «Силимар» с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Анализ осуществляли с использованием жидкостного хроматографа «Biotronic», хроматографической колонки «Phenomenex Luna C18(2)» (250x2,0 мм) и элюентной системы (мобильная фаза), представляющей собой смесь ацетонитрила и буферного раствора, подкисленного H₃PO₄ до pH 3,0, в соотношении 30:70 (изократический режим) при аналитической длине волны 288 нм. Определено, что содержание суммы флаволигнанов в образцах лекарственного препарата «Силимар» варьирует от 71,57 % до 78,43 % (в пересчете на государственный стандартный образец силибина).

Ключевые слова: лекарственные растения, расторопша пятнистая, *Silybum marianum* (L.) Gaertn., плоды, препараты, флаволигнаны, силибин, силибинин, силимар, ВЭЖХ, стандартизация.

HPLC-ANALYSIS OF PHARMACEUTICAL «SILYMAR»

¹Rosikhin D.V., ¹Kurkin V.A., ¹Ryzhov V.M., ²Platonov I.A., ²Pavlova L.V.

¹Samara State Medical University, Samara, e-mail: Kurkinvladimir@yandex.ru

²Samara State Aerospace University named academician S.P. Korolev, Samara, e-mail: pia@ssau.ru

In the present paper are discussed the results of investigations to improve of the methods of standardization of the phytopharmaceutical «Silymar», representing the total flavolignans (silymarin) of the fruits of milk thistle [*Silybum marianum* (L.) Gaertn.] and used as a hepatoprotective remedy. As a result of the carried out study has developed the method of quantitative determination of the total flavolignans in the phytopharmaceutical «Silymar» using high performance liquid chromatography (HPLC). The analysis was carried out with using the liquid chromatograph «Biotronic», chromatographic column «Phenomenex Luna C18(2)» (250x2,0 mm) and eluent system (mobile phase) comprising a mixture of acetonitrile and buffer solution, acidified with H₃PO₄ to pH 3.0, in the ratio 30:70 (isocratic mode) at analytical length waves of 288 nm. It is determined that the content of the total flavolignans in samples of the preparation «Silymar» are varied from 71,57 % to 78,43 % (calculated on the state standard sample of silybin).

Keywords: medicinal plants, milk thistle, *Silybum marianum* (L.) Gaertn., fruits, phytopharmaceuticals, flavolignans, silybin, silybinin, silymar, HPLC, standardization.

В настоящее время практическое здравоохранение остро нуждается в лекарственных средствах, обладающих способностью минимизировать влияние неблагоприятных экологических факторов. В этом отношении особый интерес представляют лекарственные препараты растительного происхождения, обладающие широким спектром фармакологической активности в сочетании с относительной безопасностью в условиях рациональной фармакотерапии. Огромный профилактический и лечебный потенциал заложен в гепатопротекторах, среди которых лидирующую роль играют препараты на основе флаволигнанов плодов расторопши пятнистой – *Silybum marianum* (L.) Gaertn., в частности,

«Силимар» [1-6, 9, 10]. Особый интерес к расторопше пятнистой возник благодаря целой серии работ зарубежных исследователей, в частности, немецких ученых [8, 10], которые по сути дела заново открыли миру это удивительное растение, выделив из плодов в середине 60-х годов оригинальные биологически активные соединения (БАС), в частности, силибин, названные флавонолигнанами [6, 10], а затем – флаволигнанами [3]. Именно это обстоятельство послужило мощным импульсом к проведению научных исследований не только за рубежом, но и в нашей стране по проблеме создания гепатопротекторных препаратов на основе плодов расторопши пятнистой. Сначала в Германии, а затем в других странах, в том числе в Российской Федерации, исследования приносят реальные результаты: созданы «Силимарин», «Легалон», «Карсил», «Силимар» и другие препараты, имеющие международное непатентованное название «Силибинин». Вышеперечисленные препараты представляют собой в основном смесь трех веществ (силимарин) – силибина, силидианина и силикрестина, обладающие уникальным гепатопротекторным действием [1-6]. В настоящее время именно по уровню содержания данных веществ оценивают качество плодов расторопши пятнистой и лекарственных препаратов на основе данного сырья [4, 5, 9]. Разработан целый ряд методик количественного определения суммы флаволигнанов, однако они не лишены недостатков, среди которых существенным является отсутствие в методиках приема использования стандартного вещества. Ранее для целей стандартизации нами предложен государственный стандартный образец (ГСО) силибина (ФС 42-0072-01) [4]. В соответствии с этим разработаны методики количественного определения суммы флаволигнанов с использованием ГСО силибина, в том числе методом ВЭЖХ [57, однако проблема совершенствования методов стандартизации по-прежнему остается актуальной.

На наш взгляд, наиболее перспективным методом для стандартизации сырья и препаратов расторопши пятнистой с учетом вариабельности химического состава данного растения является высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), которая одновременно может сочетать качественное и количественное определение флаволигнанов.

Цель данной работы – исследование по разработке методики количественного определения суммы флаволигнанов в гепатопротекторном лекарственном средстве «Силимар» с использованием ВЭЖХ.

Материал и методы исследования

Анализ лекарственного средства «Силимар» (субстанция), производство которого осуществляется в условиях ЗАО «Самаралектравы» (п. Антоновка, Самарская обл.), проводили методом обращенно-фазовой ВЭЖХ на жидкостном хроматографе «Biotronic» с УФ-детектором с использованием хроматографической колонки «Phenomenex Luna C18(2)» (250x2,0 мм) и элюентной системы (мобильная фаза), представляющей собой смесь

ацетонитрила и буферного раствора, подкисленного H_3PO_4 до pH 3,0, в соотношении 30:70 (изократический режим) при аналитической длине волны 288 нм.

УФ-спектры растворов лекарственного средства «Силимар» и ГСО силибина (ФС 42-0072-01) определяли на спектрофотометре «Specord 40» (Analytik Jena).

Результаты исследования и их обсуждение

Определено, что максимум поглощения в УФ-спектрах растворов ГСО силибина (рис. 1) и лекарственного препарата «Силимар» (рис. 2) находится при длине волны 288 нм, что свидетельствует о целесообразности проведения анализа при данной аналитической длине волны. На хроматограмме испытуемого раствора (рис. 3) пики 1, 2 и 3 принадлежат флаволигнанам силикрестину, силибину и силидианину, имеющим время удерживания 9.158 мин, 18.74 мин и 22.57 мин соответственно. Время удерживания пика ГСО силибина составляет 18.91 мин (рис. 4), что подтверждает объективность идентификации данного вещества на хроматограмме испытуемого раствора. Дополнительным доказательством идентификации силибина является введение внутренней пробы ГСО силибина в испытуемый раствор, что приводит к увеличению интенсивности пика 2 (рис. 5). Установлено также, что силикрестин и силидианин имеют хорошо воспроизводимые значения относительных времен удерживания по отношению к ГСО силибину 0,5 и 1,2 соответственно, что можно успешно использовать в анализе препарата «Силимар».

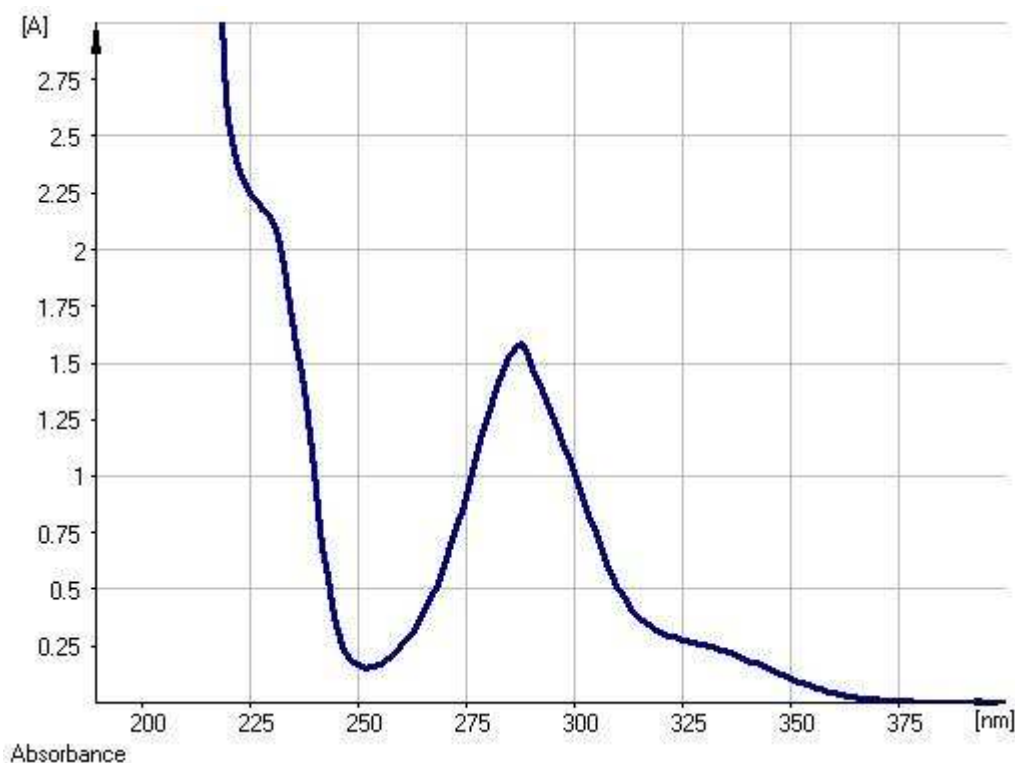


Рис. 1. УФ-спектр раствора ГСО силибина

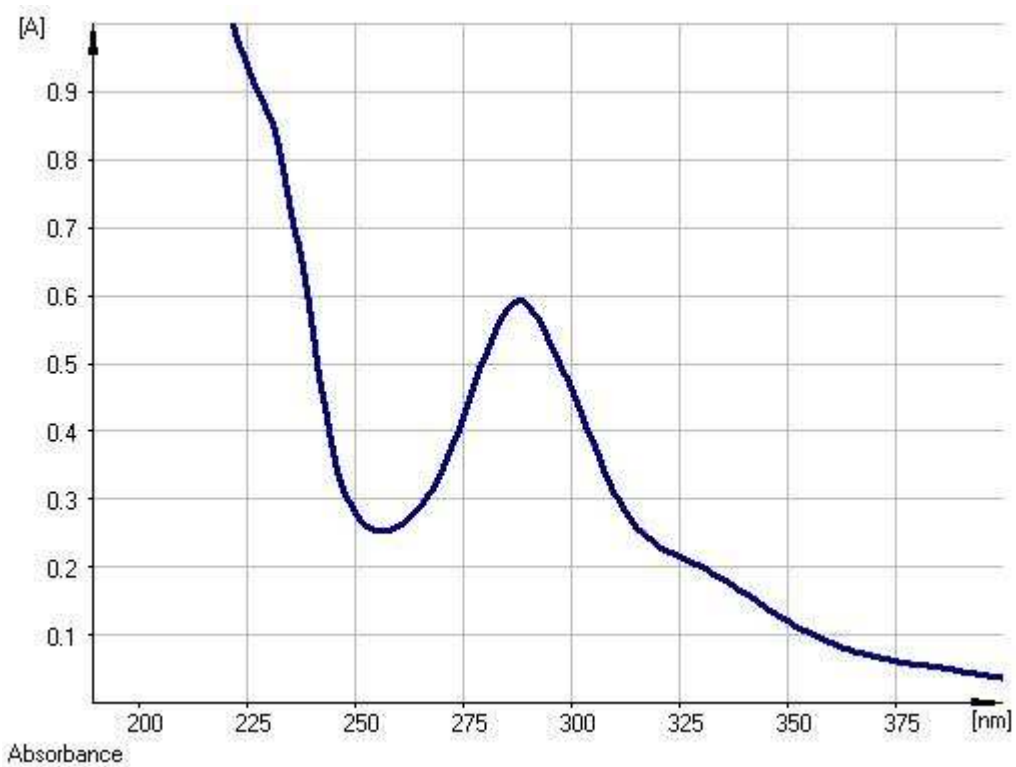


Рис. 2. УФ-спектр раствора лекарственного препарата «Силимар»

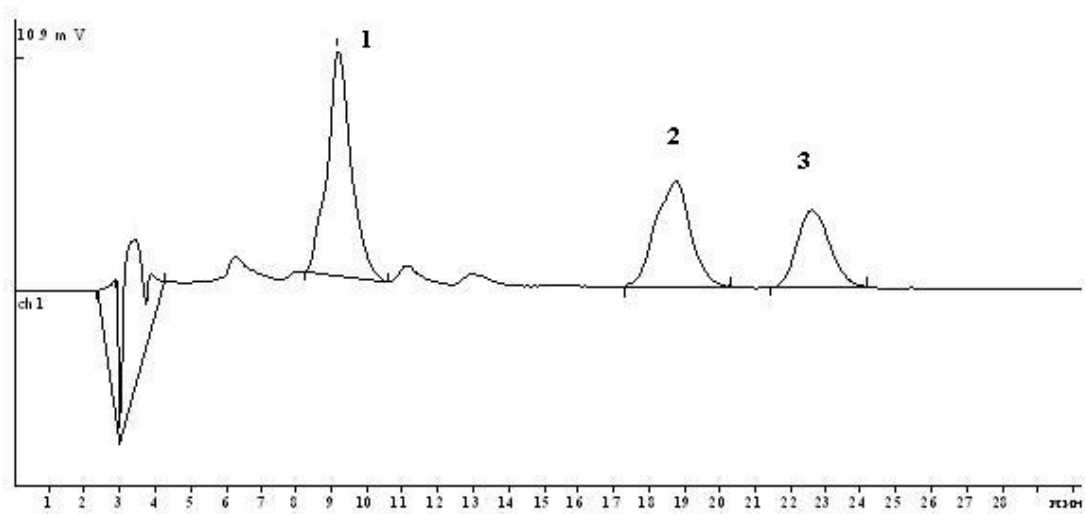


Рис. 3. Хроматографический профиль раствора препарата «Силимар»

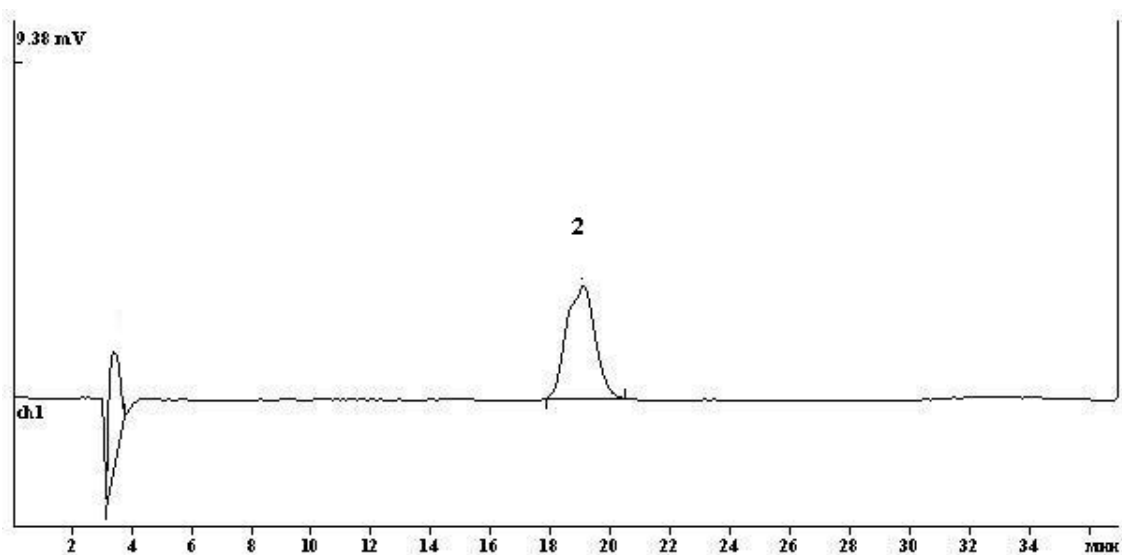


Рис. 4. Хроматографический профиль раствора ГСО силибина

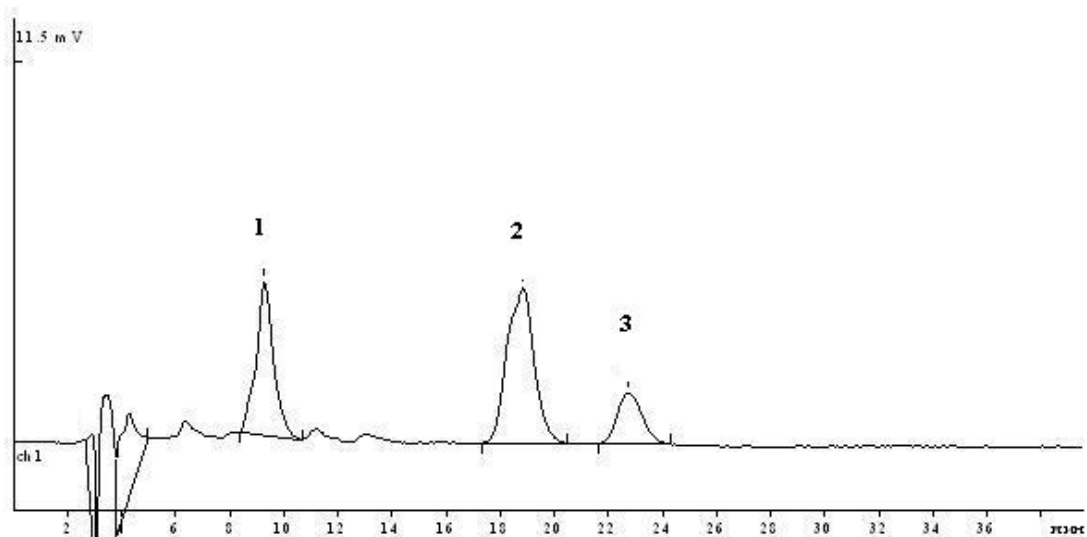


Рис. 5. Хроматографический профиль раствора препарата «Силимар» с внутренним стандартом ГСО силибина

Методика количественного определения. Около 0,05 г (точная навеска) лекарственного препарата (субстанция «Силимар») помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 25 мл спирта 95 % и растворяют при температуре от 60 °С до 70 °С на водяной бане. После охлаждения содержимого колбы объем раствора доводят спиртом 95 % до метки и перемешивают (испытуемый раствор). 20 мкл испытуемого раствора вводят в жидкостный хроматограф «Biotronic» и анализ осуществляют методом обращенно-фазовой ВЭЖХ в изократическом режиме с использованием хроматографической колонки «Phenomenex Luna C18(2)» (250x2,0 мм) и элюентной системы (мобильная фаза), представляющей собой смесь ацетонитрила и буферного раствора, подкисленного H_3PO_4 до pH 3,0, в соотношении 30:70, при аналитической длине волны 288 нм (скорость элюирования – 0,4 мл/мин).

Анализ осуществляют в трех повторностях. По 3 параллельным определениям рассчитывают среднюю площадь пика силибина, а также площадь пиков силикристина и силидианина, имеющих относительное время удерживания по отношению к ГСО силибину 0,5 и 1,2 соответственно.

Параллельно осуществляют анализ раствора А ГСО силибина при длине волны 288 нм в тех же условиях.

Содержание суммы флаволигнанов в силимаре в процентах (X) в пересчете на силибин вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S \times m_i \times 50 \times 100}{S_i \times m \times 100},$$

где:

S – Сумма значений площадей пиков силибина и двух доминирующих флаволигнанов испытуемого раствора с относительными временами удерживания по отношению к ГСО силибину 0,5 (силикрестин) и 1,2 (силидианин) на хроматограмме испытуемого раствора;

S₀ – площадь пика силибина на хроматограмме стандартного образца;

m – навеска препарата, г;

m₀ – масса силибина в растворе ГСО, г;

Определено, что содержание суммы флаволигнанов в образцах лекарственного препарата «Силимар» варьирует 71,57 % ±2,37 % до 78,43 % ±3,05 % (в пересчете на государственный стандартный образец силибина). Следовательно, в качестве нижнего предела можно рекомендовать показатель «не менее 65,0 %», как это и было предусмотрено в нормативной документации.

Ошибка единичного определения методики с доверительной вероятностью 95 % составляет ±4,85 %.

Примечания: 1. Приготовление раствора ГСО силибина (ФС 42-0072-01). Около 0,02 г (точная навеска) ГСО силибина растворяют в мерной колбе вместимостью 100 мл в 80 мл 95 % спирта при нагревании на водяной бане при температуре от 70 до 80 °С. Раствор охлаждают, доводят объем раствора до метки 95 % спиртом и перемешивают (раствор А). Срок годности раствора 1 месяц.

. Объем вводимой пробы составляет 20 мкл.

2. Приготовление элюента для ВЭЖХ.

Навеску калия гидрофосфата (ЧДА ГОСТ 2493-75) 1,36 г переносят в мерную колбу вместимостью 1 л, растворяют в воде и разбавляют водой до метки, перемешивают. Полученный раствор подкисляют раствором ортофосфорной кислоты до pH 3.00±0.01. Раствор фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор не более 0.4–0.5 мкм.

Раствор дегазируют с помощью ультразвуковой ванны непосредственно перед анализом. Раствор годен в течение 1 месяца.

3. *Проверка пригодности хроматографической системы.* Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия: эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику силибина, должна быть не менее 3000 теоретических тарелок.

Выводы

1. Разработана методика количественного определения суммы флаволигнанов в лекарственном препарате «Силимар» методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с использованием хроматографической колонки «Phenomenex Luna C18(2)» (250x2,0 мм) и элюентной системы, представляющей собой смесь ацетонитрила и буферного раствора, подкисленного H_3PO_4 до pH 3,0, в соотношении 30:70 (изократический режим) при аналитической длине волны 288 нм.

2. Определено, что содержание суммы флаволигнанов в образцах лекарственного препарата «Силимар» варьирует от 71,57 % \pm 2,37 % до 78,43 % \pm 3,05 % (в пересчете на государственный стандартный образец силибина). Ошибка единичного определения методики с доверительной вероятностью 95 % составляет \pm 4,85 %.

Список литературы

1. Куркин В.А. Фармакогнозия: Учебник для студентов фармацевтических вузов (факультетов). 2-е изд., перераб. и доп. – Самара: ООО «Офорт»; ГОУ ВПО «СамГМУ Росздрава», 2007. – 1239 с.
2. Куркин В.А., Запесочная Г.Г., Авдеева Е.В., Ежков В.Н. Фенилпропаноиды лекарственных растений: Монография. – Самара: ООО «Офорт», ГОУ ВПО «СамГМУ», 2005. – 128 с.
3. Куркин В.А., Запесочная Г.Г. Флаволигнаны и другие природные лигнаноиды. Проблемы структурного анализа // Химия природных соединений. – 1987. – № 1. – С. 11-35.
4. Куркин В.А. Фенилпропаноиды - перспективные природные биологически активные соединения. – Самара: СамГМУ, 1996. – 80 с.
5. Куркин В.А., Запесочная Г.Г., Авдеева Е.В., Рыжов В.М., Попова Л.Л., Грядунцов П.Е. Расторопша пятнистая: Монография. – Самара: ООО «Офорт», ГОУ ВПО «СамГМУ», 2010. – 118 с.
6. Куркин В.А. Расторопша пятнистая – источник лекарственных средств (обзор) // Химико-фармацевтический журнал. – 2003. – Т. 37, № 4. – С. 27-41.

7. Рыжов В.М., Куркин В.А., Авдеева Е.В., Лужнов Н.Д. Перспективы использования ВЭЖХ для стандартизации гепатопротекторного лекарственного средства «Силимар» // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2010. – № 7. – С. 26-29.
8. Janiak B., Hänsel R. Phytochemisch-pharmakognostische Untersuchungen über fructus *Cardui mariae* // *Planta Medica*. – 1960. – Vol. 8, N. 1. – P. 71-84.
9. Kurkin V.A. Phenylpropanoids from Medicinal Plants: Distribution, Classification, Structural Analysis, and Biological Activity // *Chemistry of Natural Compounds*. – 2003. – Vol. 39. – No. 2. – P. 123-153.
10. Wagner H. The antihepatotoxic principle of *Silybum marianum* Gaertn. // In: *Recent Flavonoids Research*. – Budapest: Akademiai Kiado, 1973. – P. 51-68.

Рецензенты:

Первушкин С.В., д.фарм.н., профессор, заведующий кафедрой фармацевтической технологии государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Самара;

Правдивцева О.Е., д.фарм.н., доцент кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Самара.