

# СТАНДАРТИЗАЦИЯ СИРОПА РАСТОРОПШИ

В.А. Куркин\*, доктор фармацевтических наук, профессор, Д.В. Росихин

Самарский государственный медицинский университет;

Российская Федерация, 443099, Самара, ул. Чапаевская, д. 89

**Введение.** Плоды расторопши пятнистой служат источником получения гепатопротекторных лекарственных препаратов, которые представлены в основном таблетками, капсулами, драже. Жидкую лекарственную форму – сироп – из плодов расторопши в настоящее время не получают. Флаволигнаны – ведущая группа биологически активных соединений плодов расторопши пятнистой, обуславливающая гепатопротекторный эффект препаратов.

**Цель исследования** – разработка методик качественного и количественного определения действующих веществ в сиропе расторопши.

**Материал и методы.** Объект исследования – сироп на основе жидкого экстракта расторопши и сорбита. Для хроматографического анализа использовали пластинки «Сорбфил ПТСХ-АФ-А-УФ» и систему растворителей: углерод четыреххлористый–ацетонитрил (6:4). Изучение УФ-спектров и разработку методики количественного определения проводили с помощью спектрофотометра «Spectord 40» (Analytik Jena).

**Результаты и обсуждение.** Предложена методика качественного хроматографического анализа препарата «Расторопши сироп», основанная на обнаружении флаволигнанов. На хроматограмме испытуемого раствора обнаруживаются: пятно силибина (доминирующего флаволигнана), а также силидианина, силикристина и 2,3-дегидросилибина. Разработана методика количественного определения в сиропе расторопши суммы флаволигнанов в пересчете на силибин методом прямой спектрофотометрии (аналитическая длина волны – 289 нм). Содержание суммы флаволигнанов в препарате колеблется от 0,21±0,01 до 0,23±0,01%.

**Заключение.** Разработаны методики качественного анализа и количественного определения флаволигнанов в сиропе расторопши. Ошибка единичного определения с достоверной вероятностью 95% составляет ±3,57%.

**Ключевые слова:** расторопша пятнистая, *Silybum marianum* (L.) Gaertn., плоды, экстракт расторопши, сироп, стандартизация, флаволигнаны, силимарин, силибин, силидианин, силикристин, дегидросилибин, спектрофотометрия.

Е-mail: Kurkinvladimir@yandex.ru

## ВВЕДЕНИЕ

Плоды расторопши пятнистой – *Silybum marianum* (L.) Gaertn. – служат источником получения гепатопротекторных препаратов, среди которых наиболее известны «Легалон», «Карсил», «Силимарин», «Силимар», имеющие общее международное непатентованное название «Силибинин». В Российской Федерации из плодов культивируемой расторопши пятнистой получают препараты «Силимар», «Сибектан» и биологически активные добавки, в частности липосил и др. [7, 11].

Гепатопротекторный эффект препаратов обусловлен присутствием ведущей группы биологически активных соединений (БАС) плодов расторопши пятнистой – флаволигнанами, производными флавоноидов и фенилпропаноидов [2–13]. К основным флаволигнанам растения относят силибин, силидианин и силикристин, являющиеся диастереоизомерами. Выделенная из плодов расторопши пятнистой и названная силимарином сумма флавоноидов, содержащая флаволигнаны силибинин, силидианин, силикристин (см. таблицу), внедрена в клиническую практику в качестве специфических гепатопротекторных средств. Согласно данным литературы [8], гепатопротекторной активностью обладает 2,3-дегидросилибин (см. рис. 1).

Флаволигнаны взаимодействуют со свободными радикалами в клетках печени, в результате чего снижают их токсичность. Прерывая процесс перекисного окисления липидов, флаволигнаны препятствуют дальнейшему разрушению клеточных структур. Кроме того, эти вещества оказывают положительное влияние на желчевыделительную и дезинтоксикационную функцию печени и обладают антиоксидантной, слабой противовоспалительной и спазмолитической активностью. Показания к применению: гепатит, цирроз печени [3, 11].

В настоящее время на фармацевтическом рынке представлены в основном твердые лекарственные формы из плодов расторопши пятнистой – таблетки, капсулы, драже [7, 11]. Жидкая лекарственная форма – сироп – не представлена. Сиропа широко используются в педиатрической практике. Создание сиропа расторопши на основе сорбита позволило бы использовать его при заболеваниях печени не только в педиатрической, но и гериатрической практике, а также у больных, страдающих сахарным диабетом.

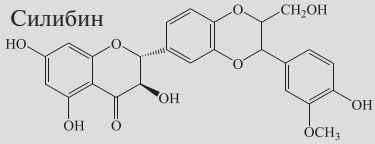
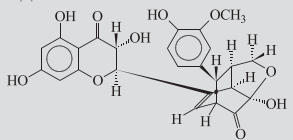
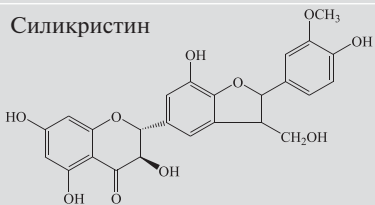
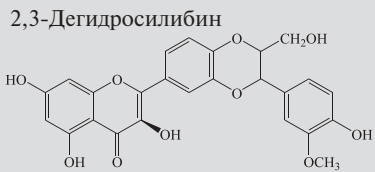
Для введения нового лекарственного средства (ЛС) в клиническую практику необходима разработка нормативного документа, в частности разделов фармакопейной статьи «Подлинность» и «Количественное определение».

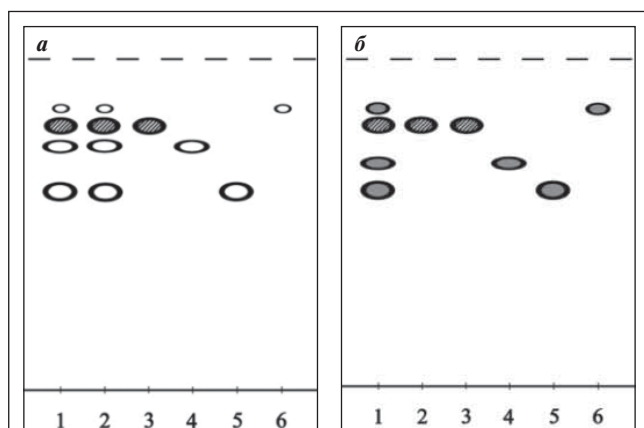
Цель исследования – разработка методик качественного и количественного определения действующих веществ в сиропе расторопши.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ**

Объектом исследований стал образец сиропа на основе жидкого экстракта расторопши, полученный на кафедре фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии Самарского государственного ме-

**ХИМИЧЕСКИЕ СТРУКТУРЫ  
ОСНОВНЫХ ФЛАВОЛИГНАНОВ  
ПЛОДОВ РАСТОРПШИ ПЯТНИСТОЙ**

Название и структурная формула	Физико-химические константы
<p><b>Силибинин</b></p> 	$C_{25}H_{22}O_{10}$ Т. пл. 164–168°C $[\alpha]_D + 10,8^\circ$ (ацетон) $\lambda_{max}$ 289, 325 (пл) нм
<p><b>Силидианин</b></p> 	$C_{25}H_{22}O_{10}$ (M <sup>+</sup> 482) Т. пл. 189–191°C $[\alpha]_D + 218^\circ$ (этанол) $\lambda_{max}$ 288, 322 (пл) нм
<p><b>Силикрестин</b></p> 	$C_{25}H_{22}O_{10}$ (M <sup>+</sup> 482) Т. пл. 174–177°C $[\alpha]_D + 80,5^\circ$ (пиридин) $\lambda_{max}$ 289, 325 (пл) нм
<p><b>2,3-Дегидросилибин</b></p> 	$C_{25}H_{20}O_{10}$ Т. пл. 275–277°C $\lambda_{max}$ 267, 365 нм



**Рис. 1.** Хроматографический профиль сиропа расторопши:  
 а – хроматограмма в УФ-свете 254 нм;  
 б – хроматограмма после обработки реактивом ДСК.  
 1 – жидкий экстракт расторопши; 2 – сироп расторопши;  
 3 – ГСО силибина; 4 – РСО силидианина,  
 5 – РСО силикрестина, 6 – РСО 2,3-дегидросилибина

дицинского университета. В качестве основы сиропа использовали сорбит. Жидкий экстракт расторопши получали методом дробной мацерации со стадией нагрева в соотношении 1:1 на 80% этиловом спирте, используя в качестве сырья жом плодов расторопши пятнистой (ЗАО «Самаралектравы»). На основе результатов ряда исследований доказано, что нативный комплекс соединений экстракта расторопши превосходит «Силимарин» по влиянию на ферментативные и неферментативные звенья антиоксидантной защиты [7].

Обычно при анализе сиропов метод тонкослойной хроматографии (ТСХ) не применяется, поскольку при нанесении сиропа на хроматографическую пластинку не удается добиться достаточного разделения веществ. Поэтому нами предложена пробоподготовка, основанная на экстракции флаволигнанов из сиропа ацетоном с последующим нанесением ацетонового извлечения на пластинку. Ацетон был выбран в качестве экстрагента ввиду того, что он не смешивается с сиропом из-за значительной разности их плотностей. В то же время ацетон позволяет добиться достаточно полной экстракции действующих веществ из такой лекарственной формы, как сироп.

Для проведения ТСХ-анализа 5 мл сиропа помещали в делительную воронку, добавляли 1 каплю ледяной уксусной кислоты (в целях полного извлечения действующих веществ), тщательно перемешивали. Далее добавляли 5 мл ацетона, экстрагировали в течение 10 мин и затем ацетоновый слой отделяли.

На линию старта хроматографической пластинки «Сорбфил ПТСХ-АФ-А-УФ» 10×15 см наносили: 10 мкл жидкого экстракта расторопши, 10 мкл ацетонового извлечения и 20 мкл раствора стандартного образца (СО) силибина. При разработке методики ТСХ-анализа также были использованы РСО силидианина, силикрестина и 2,3-дегидросилибина (рис. 1) Пластинку с нанесенными пробами сушили и помещали в хроматографическую камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 2 ч смесью растворителей: углерод четыреххлористый – ацетонитрил в соотношении (6:4) и хроматографировали. Когда фронт растворителей пройдет около 80–90% длины пластинки от линии старта, ее вынимали из камеры, сушили до удаления следов растворителей и просматривали в УФ-свете при длине волны  $\lambda=254$  нм.

Обнаружение пятен проводили в УФ-свете ( $\lambda=254$  нм) до и после обработки свежеприготовленным раствором диазобензолсульфо кислоты (фенольные соединения) [1]. Для приготовления щелочного раствора диазобензолсульфо кислоты (ДСК) 0,01 г диазобензолсульфо кислоты растворяли в 10 мл 10% раствора натрия карбоната. Раствор использовали свежеприготовленным (для обнаружения фенольных соединений).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С помощью ТСХ-метода было достигнуто четкое разделение доминирующих флаволигнанов – силибина, силидианина, силикристина, 2,3-дегидросилибина, которые при обработке хроматограммы УФ-светом  $\lambda=254$  нм обнаруживаются в виде доминирующих пятен с яркой фиолетовой флуоресценцией с величиной Rf силибина, силидианина и силикристина 0,8 (на уровне пятна ГСО силибина), 0,7; 0,85 и 0,6 соответственно. Кроме того, на хроматограмме обнаруживается пятно 2,3-дегидросилибина (см. рис. 1). После обработки свежеприготовленным диазореактивом и выдерживании в сушильном шкафу при температуре 105°C в течение 5 мин сироп расторопши на хроматограмме также детектируется пятном ярко-оранжевого цвета, что свидетельствует о том, что силибин является доминирующим флаволигнаном.

Количественное определение флаволигнанов в сиропе расторопши проводили методом прямой спектрофотометрии на спектрофотометре «Specord 40» (Analytik Jena) при длине волны 289 нм в пересчете на ГСО силибина. Анализ УФ-спектров сиропа расторопши показал наличие максимума при  $\lambda=289$  нм, характерного для раствора ГСО силибина (рис. 2).

Для количественного определения суммы флаволигнанов в пересчете на силибин 1 мл сиропа расторопши помещали в мерную колбу на 25 мл и доводили водой очищенной до метки (раствор А). 5 мл раствора А переносили в мерную колбу на 25 мл и доводили до метки 96% этиловым спиртом (раствор Б). Оптическую плотность раствора Б измеряли на спектрофотометре при длине волны 289 нм в кювете с толщиной слоя 1 см. В качестве раствора сравнения использовали 95% этиловый спирт.

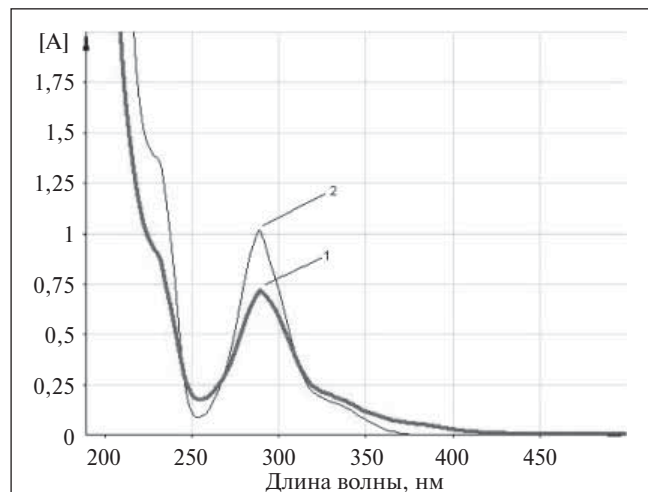


Рис. 2. УФ-спектры сиропа расторопши (1) и раствора ГСО силибина (2)

Параллельно измеряли оптическую плотность при длине волны 289 нм спиртового раствора Б ГСО силибина.

**Приготовление раствора ГСО силибина.** Около 0,02 г (точная навеска) ГСО силибина растворяли в мерной колбе вместимостью 100 мл в 80 мл 95% этилового спирта при нагревании на водяной бане при температуре от 70°C до 80°C. Раствор охлаждали, доводили объем раствора до метки 95% этиловым спиртом и перемешивали (раствор А). 1 мл раствора А переносили в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводили объем раствора до метки 95% этиловым спиртом и перемешивали (раствор Б).

Количественное определение суммы флаволигнанов проводили методом прямой спектрофотометрии в пересчете на силибин. Содержание суммы флаволигнанов в пересчете на силибин в сиропе расторопши (X) в % рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{D \cdot m_0 \cdot 100 \cdot 25 \cdot 25}{D_0 \cdot m \cdot 100 \cdot 25 \cdot 5},$$

где D – оптическая плотность исследуемого раствора;  $D_0$  – оптическая плотность раствора ГСО силибина; m – масса сиропа, г;  $m_0$  – масса субстанции, г.

Содержание суммы флаволигнанов в пересчете на силибин можно вычислять с использованием величины удельного показателя поглощения силибина по формуле:

$$X = \frac{D \cdot 25 \cdot 25}{450 \cdot 5},$$

где D – оптическая плотность исследуемого раствора; 450 – удельный показатель поглощения ( $E_{1\%}^{1\text{см}}$ ) ГСО силибина при длине волны  $\lambda=289$  нм.

Содержание суммы флаволигнанов в сиропе расторопши колеблется от  $0,21 \pm 0,01$  до  $0,23 \pm 0,01\%$ . Ошибка единичного определения с доверительной вероятностью 95% составляет  $\pm 3,57\%$ .

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложены подходы к стандартизации сиропа расторопши, включающие качественный анализ флаволигнанов в сиропе и определение их количественного содержания. Разработана методика ТСХ-анализа сиропа расторопши, основанная на обнаружении основных флаволигнанов с использованием ГСО силибина.

Разработана методика количественного определения в сиропе расторопши суммы флаволигнанов в пересчете на силибин методом прямой спектрофотометрии (аналитическая длина волны – 289 нм). Ошибка единичного определения содержания суммы флаволигнанов в сиропе расторопши с доверительной вероятностью 95% составляет  $\pm 3,57\%$ .

ЛИТЕРАТУРА

1. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII издание. Т.3. М., 2015; 594–9.
2. Куркин В.А. Фармакогнозия. 2-е изд. Самара: Офорт, СамГМУ, 2007; 1239.
3. Куркин В.А., Лебедев А.А., Запесоchnая Г.Г. и др. Антиоксидантные свойства флаволигнанов плодов *Silybum marianum* (L.) Gaertn. Растительные ресурсы, 2003; 39 (1): 89–92.
4. Куркин В.А. Фенилпропаноиды – перспективные природные биологически активные соединения. Самара: СамГМУ, 1996; 80.
5. Куркин В.А. Фенилпропаноиды лекарственных растений. Распространение, классификация, структурный анализ, биологическая активность. Химия природных соединений, 2003; 2: 87–110.
6. Куркин В.А., Запесоchnая Г.Г. Флаволигнаны и другие природные лигнаны. Проблемы структурного анализа. Химия природных соединений, 1987; 1: 11–34.
7. Куркин В.А. Расторопша пятнистая – источник лекарственных средств. Химико-фармацевтический журнал, 2003; 37 (4): 27–41.
8. Куркин В.А. Современные аспекты химической классификации биологически активных соединений лекарственных растений. Фармация, 2002; 50 (2): 8–16.
9. Куркин В.А. Основы фитотерапии. Самара: Офорт, СамГМУ, 2009; 963.
10. Куркин В.А. Запесоchnая Г.Г., Авдеева Е.В., Рыжов В.М., Попова Л.Л., Грядунев П.Е. Расторопша пятнистая. Самара: СамГМУ, Офорт; 2010: 118.
11. Луценко С.В., Фельдман Н.Б., Луценко Е.В., Быков В.А. Растительные флаволигнаны. Биологическая активность и терапевтический потенциал. М., 2006; 235.
12. Муравьева Д.А., Самылина И.А., Яковлев Г.П. Фармакогнозия. М.: Медицина, 2002; 656.
13. 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: 26–9.

Поступила 14 октября 2016 г.

STANDARDIZATION OF MILK THISTLE (*SILYBUM MARIANUM*) SYRUP

Professor V.A. Kurkin, PhD; D.V. Rosikhin

Samara State Medical University; 89, Chapayevskaya St., Samara 443099, Russian Federation

SUMMARY

**Introduction.** Milk thistle (*Silybum marianum*) fruits are a source of hepatoprotective drugs that are mainly tablets, capsules, and drag es. The liquid formulation (milk thistle syrup) is not currently prepared. Flavonolignans are a leading group of biologically active compounds of milk thistle fruits, which determines the hepatoprotective effect of drugs.

**Objective:** to develop procedures for the qualitative and quantitative determination of active ingredients in holy thistle syrup.

**Material and methods.** The syrup based on liquid milk thistle extract and sorbitol was a matter for this investigation. Sorbfil PTSH-AF-A-UV plates and a system of solvents, such as carbon tetrachloride–acetonitrile (6:4), were used for chromatographic analysis. A Specord 40 spectrophotometer (Analytik Jena) was employed to study UV spectra and to devise a procedure for quantitative determination.

**Results and discussion.** A procedure for qualitative chromatographic analysis of the drug milk thistle syrup was proposed, which was based on the detection of flavonolignans. The chromatogram of the test solution showed a spot of silybin, a dominant flavonolignan, as well as silydianin, silycristin, and 2,3-dehydrosilybin. A procedure was developed to quantify in what amounts the milk thistle syrup contained flavonolignans calculated with reference to silybin by direct spectrophotometry (a detection wavelength of 289 nm). The amount of flavonolignans in the syrup ranged from 0.21±0.01 to 0.23±0.01%.

**Conclusion.** Procedures have been developed for the qualitative analysis and quantitative determination of flavonolignans in the milk thistle syrup. The error of a single determination with a confidence level of 95% is ±3.57%.

**Key words:** milk thistle, *Silybum marianum* (L.) Gaertn., fruits, milk thistle extract, syrup, standardization, flavonolignans, silymarin, silybin, silydianin, silycristin, dehydrosilybin, spectrophotometry.

REFERENCES

1. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. 13-th ed. Vol.3. Moscow, 2015; 594–9 (in Russian).
2. Kurkin V.A. Pharmacognosy. 2nd ed. Samara: Ofort; SamGMU, 2007; 1239 (in Russian).
3. Kurkin V.A., Lebedev A.A., Zapesochnaya G.G. et al. Antioxidant characteristics of flavonolignans of *Silybum marianum* fruits. Rastitelnye resursy, 2003; 39 (1): 89–92 (in Russian).
4. Kurkin V.A. Phenylpropanoids – promising natural biological activity compounds. Samara: SamGMU, 1996; 80 (in Russian).
5. Kurkin V.A. Phenylpropanoids from Medicinal Plants: Distribution, Classification, Structural Analysis, and Biological Activity. Chemistry of Natural Compounds, 2003; 39: 87–110 (in Russian).
6. Kurkin V.A., Zapesochnaya G.G. Flavolignans and other natural lignoids: problems of structural analysis. Chemistry of Natural Compounds, 1987; 1: 11–34 (in Russian).
7. Kurkin V.A. *Silybum marianum* (L.) Gaertn. is the perspective source of pharmaceuticals. Khimiko-Pharmatsevticheskiy Zhurnal, 2003; 37 (4): 27–41 (in Russian).
8. Kurkin V.A. Modern aspects of chemical classification of biologically active compounds of medicinal plants. Farmatsiya, 2002; 50 (2): 8–16 (in Russian).
9. Kurkin V.A. Elements of phytotherapy: study guide for students of pharmaceuticals universities. Samara: Ofort, SamGMU, 2009; 963 (in Russian).
10. Kurkin V.A., Zapesochnaya G.G., Avdeeva E.V., Ryzhov V.M., Popova L.L., Gryadunov P.E. *Silybum marianum*. Samara: Ofort, SamGMU, 2010; 118 (in Russian).
11. Lutsenko S.V., Feldman N.B., Lutsenko E.V., Bykov V.A. Herbal flavonolignans. Bioactivity and therapeutic potential. Moscow, 2006; 235 (in Russian).
12. Muravjeva D.A., Samylina I.A., Jakovlev G.P. Pharmacognosy. Moscow: Medicine, 2002; 656 (in Russian).
13. Ryzhov V.M., Kurkin V.A., Avdeeva E.V., Luzhnov N.D. The perspectives of the using of hplc for the standardization of the hepatoprotective pharmaceutical «Silymar». Vorposy Biologicheskoi, Meditsinskoi i Farmatsevticheskoi Khimii, 2010; 7: 26–9 (in Russian).