شناسایی و تعیین مقدار سیلی‌مارین در گیاه خار مریم (*Silybum marianum*) و چند فرآورده دارویی آن

قاسم حقی[1] مرتضی پیرعلی[2]

چکیده

خارمریم با نام علمی *Silybum marianum* گیاهی است دو ساله از خانواده کمپوزیته به ارتفاع دو متر که به حالت خودرو در کنار جاده‌ها و اراضی متروک در مناطق شمالی ایران می‌روید. میوه این گیاه در پیشگیری و درمان آسیب‌های توکسیک- متابولیک کبد ناشی از مواد مختلف و نیز در درمان هپاتیت حاد از اهمیت خاصی بر خوردار است. مواد مؤثره این گیاه از ایزومرهای سیلیبین، سیلی دیانین و سیلی‌کریستین تشکیل شده است که غالباً سیلیمارین نامیده می‌شوند. سیلیمارین اثر ضد سمی داشته و رژنراسیون بافت کبدی را تحریک می‌کند. بذر این گیاه در فصل تابستان ۱۳۷۹ از اطراف اصفهان و نیز مزرعه تحقیقاتی این شرکت جمع‌آوری شد. سیلیمارین بذرهای مذکور و یک نمونه بذر وارداتی و چند نمونه فرآورده دارویی با حلال مناسب استخراج گردید، و به روش TLC و HPLC در مقایسه با مواد استاندارد شناسایی شد. سپس به وسیله اسپکتروفتومتری و کروماتوگرافی مایع با کارکرد بالا (HPLC) به روش استاندارد داخلی تعیین مقدار شد. همچنین اثر حلالهای مختلف روی راندمان استخراج سیلیمارین از گیاه بررسی گردید. نتایج حاصل از روش اسپکترومتری نشان داد که در این روش فقط تعیین مقدار کل ایزومرها امکان پذیر است. درحالی‌که در HPLC تعیین جداگانه تک تک اجزای مخلوط سیلیمارین وجود داشت، از سیلیمارین (تهیه شده از

۱- واحد تحقیق و توسعه شرکت داروسازی بازیج اسانس

۲-دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران

شرکت Roth) به عنوان ماده استاندارد و آلفا نفتل به عنوان ماده استاندارد داخلی استفاده گردید. مقدار سیلیمارین در دو نمونه بذر داخلی برابر ۱/۵ درصد و نمونه وارداتی ۲/۳ درصد بود. در چند نمونه قرص Ardeyhepan و Silymarin 140 von ct ساخت آلمان به طور متوسط به‌ترتیب ۱۲۸ و ۱٦۱ میلی‌گرم سیلیمارین مشاهده شد که یک مقدار اضافی ۲۸ درصدی و ۱۵ درصدی از مقدار اعلام شده را نشان می داد

واژه‌های کلیدی: سیلیبین، سیلی‌دیابین، سیلی‌کریستین، خارمریم، *Silybum marianum*

مقدمه

خارمریم با نام علمی *Silybum marianum* گیاهی است دو ساله از خانواده کمپوزیته به ارتفاع دو متر که به حالت خودرو در کنار جاده‌ها و اراضی متروک در مناطق شمالی ایران می‌روید(زرگری، ۱۳۷۰). بذر گیاه حاوی ۳-۱/۵ درصد فلاون لیگنان، ۳۰-۲۰درصد روغن ثابت، ۳۰-۲۵درصد پروتئین، ۰/۰۳۸درصد توکوفرول، ۰/٦۳درصد استرول‌ها شامل کمپسترول، استیگماسترول، سیتوسترول و مقداری موسیلاژ می‌باشد. میوه این گیاه در پیشگیری و درمان آسیبهای توکسیک ـ متابولیک ناشی از مواد مختلف در کبد و نیز در درمان هپاتیت حاد از اهمیت خاصی برخوردار است مواد مؤثر این گیاه از ایزومرهای سیلی‌بین[1]، سیلی‌دیانین[2] و سیلی کریستین[3] تشکیل شده است که غالباً سیلیمارین[4] نامیده می‌شوند(Fintelmann و Weiss، ۲۰۰۰، Blumenthal و همکاران، ۲۰۰۰).

1 - Silybin
2 Silidianin
3 Silycristin
4 - Silymarin

هدف از این تحقیق ارزیابی کیفی و کمی مواد مؤثر در بذر گیاه و تهیه یک عصاره مناسب جهت ساخت یک فرآورده دارویی بود.

۲- مواد و روشها

۲-۱ – جمع آوری گیاه

بذر خارمریم از قهدریجان اصفهان و نیز مزرعه تحقیقاتی شرکت باریج اسانس (در اطراف کاشان، جاده مشهد اردحال) جمع‌آوری شد و یک نمونه بذر وارداتی از وزارت جهاد کشاورزی تهیه گردید. مخلوط سیلی دیانین و سیلی کریستین شرکت Roth، اتر نفت، متانول، استون و آلفا- نفتول شرکت مرک استفاده شد.

۲-۲- دستگاهها

الف) دستگاه اسپکتروفتومتر: مدل Perkin Elmer 550s برای تعیین مقدار سیلی‌مارین به کار برده شد.

ب) از دستگاه HPLC : با مشخصات Waters 600E، ستون C_{18} به طول ۱۰۰ میلی‌متر و قطر ٤/٦ میلی‌متر دتکتور UV در ۲۸۸نانومتر برای جداسازی و شناسایی فلاوانولیگنانها استفاده گردید. فاز متحرک شامل آب، متانول، اسید استیک (٦٠:٤٠:٥)، سرعت جریان فاز متحرک ۱/۳ میلی‌لیتر بر دقیقه و مقدار نمونه تزریق شده ۱۰ میکرولیتر می‌باشد(Steingigen، ۱۹۸۳، Rajaskaran، ۱۹۹۷ و Wagner، ۱۹۷۷).

۲-۳- روش کار

۲-۳-۱- شناسایی سیلیمارین به روش TLC

۱ گرم پودر میوه خارمریم ۲ بار با ۲۵ml اتر نفت تحت شرایط رفلاکس به مدت ۳۰ دقیقه چربی‌زدایی گردیده و عصاره اتری را دور ریخته، باقیمانده با ۲۵ml متانول به

مدت ۱۵ دقیقه تحت شرایط رفلاکس حرارت داده شد. عصاره متانولی فیلتر شده تا حجم ۲mlتغلیظ و صاف گردید. ۳۰µl آن بر روی صفحه سیلیکاژل Si60 ساخت مرک به طول ۲۰mm کاشته و داخل تانک محتوی فاز متحرک کلروفرم، استن و اسید فرمیک به نسبت ۱٦:۷۵ :۸/۵ قرار داده شد. پس از اینکه حلال۱۰cm روی صفحه سیلیکاژل پیشرفت کرد صفحه از تانک خارج شد و با هوای گرم خشک گردید و سپس با معرف NP(Natural Product) ۱٪ متانولی و(Poly Etylen Glycol) PE ۵٪ اتانولی به ترتیب روی آن اسپری شد. چندین نوار رنگی مشاهده گردید که با توجه به رفرانس و مواد استاندارد این نوارها به شرح زیر می‌باشند(Wagner و Bladt، ۱۹۹٦).

۱- نوار زرد مایل به نارنجیRf=۰/۳۱ (سیلیکریستین) ، ۲- نوار زرد مایل به نارنجیRf=۰/۳٦(سیلیدیانین) ۳- نوارزردRf= ۰/٤۵(تاکسی فولین)، ٤- نوار زرد کم رنگRf=۰/۵٦(سیلیبین)،۵- نوار زرد بسیار کم رنگ Rf=۰/٦۳(ایزوسیلی‌بین)

محلول استاندارد

۱۰ میلی گرم مخلوط سیلیدیانین و سیلیکریستین شرکت Roth با متانول در یک بالون ژوژه ۱۰ میلی‌لیتری به حجم رسانده شد. ۰/۲، ۰/٤، ۰/٦، ۰/۸، ۱ و ۱/۲ از این محلول جداگانه در یک بالون ژوژه با متانول تا حجم ۱۰ میلی‌لیتر رقیق گردید و ۱٤۰ میکرولیتر از محلول استاندارد داخلی به آنها اضافه شد. ۱۰ میکرولیتر از هرکدام محلول سه بار به دستگاه تزریق شد و منحنی استاندارد رسم گردید(شکل ۱،۲).

محلول نمونه

۱۰۰میلی‌گرم پودر بذر خارمریم دوبار با ۱۰ میلی‌لیتر متانول به مدت ۱ساعت رفلاکس شد. عصاره با کاغذ واتمن نمره ۱ صاف گردید. باقیمانده با ۵ میلی‌لیتر حلال شسته و به عصاره اضافه شد و عصاره تا حجم ۲۵ میلی‌لیتر متانول در بالون ژوژه رقیق

گردید به ۱۰ میلی‌لیتر آن ۱٤۰میکرولیتر محلول استاندارد داخلی اضافه شد و ۱۰ میکرولیتر آن ۳ بار به دستگاه تزریق گردید(شکل ٤، ۳).

۱۰ عدد قرص پس از محاسبه میانگین وزن آنها پودر گردید. ۲۰ میلی گرم آن دو بار با ۱۰میلی‌لیتر متانول به مدت ۱ ساعت رفلاکس شد. عصاره صاف گردید و باقیمانده با ۵ میلی‌لیتر متانول شسته و به عصاره اضافه شد. عصاره در یک بالون ژوژه با متانول تا حجم ۲۵ میلی‌لیتر رقیق گردید. به ۱۰ میلی‌لیتر آن ۱٤۰ میکرولیتر ماده استاندارد داخلی اضافه شد. ۱۰میکرولیتر آن سه بار به دستگاه تزریق گردید (شکل ٦، ۵).

۲-۳-۲ - تعیین مقدار سیلیمارین در بذر گیاه و قرص آن به‌روش اسپکتروفتومتری

الف - معرف دی نیتروفنیل هیدرازین

۱ گرم دی نیتروفنیل هیدرازین خشک با ۲ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ در یک بالون ژوژه ۱۰۰ میلی‌لیتری با متانول به حجم رسانده شد.

ب- محلول متانولی پتاسیم هیدروکسید

۱۰ گرم پتاس در ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل گردید و در بالون ژوژه ۱۰۰ میلی‌لیتری با متانول به حجم رسانده شد.

ج ـ تعیین مقدار سیلیمارین در بذر گیاه

۵ گرم پودر گیاه به مدت ۵ ساعت در یک دستگاه سوکسله با حلال اتر نفت چربی‌زدایی گردید. بعد از خشک شدن پودر در هوا، با حلال متانول به مدت ۵ ساعت در دستگاه سوکسله عصاره‌گیری شد و در خلاء تقریباً تا حجم ۳۰ میلی‌لیتر تغلیظ گردید و با متانول در یک بالون ژوژه ۵۰ میلی‌لیتری به حجم رسانده شد. در یک بالون ژوژه ۱۰ میلی‌لیتری دو میلی‌لیتر معرف دی نیتروفنیل هیدرازین سولفوریک اسید و ۱ میلی‌لیتر محلول آزمایش را وارد نموده و با محکم نمودن درب آن، به مدت ۵۰ دقیقه

در دمای ۵۰ درجه حرارت داده می‌شود. پس از سرد شدن با محلول متانولی پتاسیم هیدروکسید به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد و خوب مخلوط گردید. بعد از دو دقیقه، ۰/۲ میلی‌لیتر محلول را با ٤ میلی‌لیتر متانول در یک لوله رقیق نموده و با سرعت ٤۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. محلول رنگی زلال به داخل بالون منتقل گردید و باقیمانده مجدداً با ٤ میلی‌لیتر متانول مخلوط و سانتریفوژ شد. محلول زلال به بالون منتقل و با متانول تا حجم ۱۰ میلی‌لیتر رقیق گردید و جذب محلول در طول موج ٤۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. با توجه به ضریب جذب مخصوص ($\varepsilon_{1\%}$=585) مقدار درصد سیلیمارین بر اساس سیلیبین در بذر گیاه محاسبه شد (The German Pharmacopiea، ۱۹۹۷).

د ـ تعیین مقدار سیلیمارین در قرص

۱۰ عدد قرص پودر شد و میانگین وزن یک قرص با ٤۰میلی‌لیترمتانول به مدت یک ساعت رفلاکس شد پس از فیلتر، باقیمانده و صافی با ۱۰ میلی‌لیتر متانول شسته و در بالون ژوژه ۵۰ میلی‌لیتری به حجم رسانده شد. ۱ میلی‌لیتر از این محلول و ۲ میلی‌لیتر معرف دی نیتروفنیل هیدرازین سولفوریک اسید در یک بالون ژوژه ۱۰ میلی‌لیتری وارد نموده و با بستن درب آن، به مدت ۵۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه حرارت داده شد. پس از سرد شدن، با محلول متانولی پتاسیم هیدروکسید به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد و خوب مخلوط گردید. بعد از دو دقیقه، ۰/۲میلی‌لیتر محلول را با ٤ میلی‌لیتر متانول در یک لوله رقیق نموده و با سرعت ٤۰۰۰دور بر دقیقه سانتریفوژ شد. محلول رنگی زلال به داخل بالون منتقل گردید و باقیمانده مجدداً با ٤میلی‌لیتر متانول مخلوط و سانتریفوژ شد. محلول زلال به بالون منتقل و با متانول تا حجم ۱۰ میلی‌لیتر رقیق گردید و جذب محلول در طول موج ٤۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. با توجه به ضریب جذب مخصوص

($\varepsilon_{1\%}$=585) و معادله بیرلامبر مقدار درصد سیلیمارین بر اساس سیلیبین در قرص محاسبه شد.

۳- نتایج

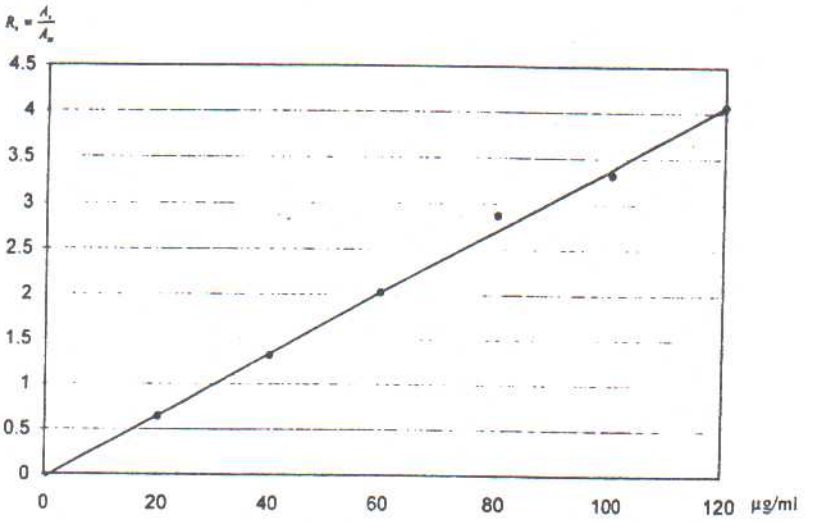
نتایج حاصل از تعیین مقدار سیلیمارین در بذر گیاه و فرآورده دارویی آن به روش اسپکتروفتومتری و HPLC در جدول زیر نشان داده شده است. مقدار سیلیمارین در دو نمونه دارویی (قرص) و سه نمونه بذر به روش اسپکتروفتومتری و به روش HPLC اندازه‌گیری شد. در روش HPLC امکان تعیین دقیق و تک تک اجزاء سیلیمارین وجود داشت. در دو نمونه بذر داخلی مقدار ماده مؤثره ۱/۵ درصد و در بذر وارداتی ۲/۳ درصد بر اساس سیلی بین به روش اسپکتروفتومتری بود. در فارماکوپه آلمان (DAB 10) و PDR حداقل مقدار سیلیمارین در بذر خار مریم حداقل ۱/۵ درصد ذکر شده است (The German Pharmacopiea، ۱۹۹۷ و PDR، ۲۰۰۰). بنابراین از بذر گیاه مورد آزمایش می‌توان فرآورده دارویی تهیه کرد. مقدار ماده مؤثره بر اساس سیلیبین به روش اسپکتروفتومتری در دو نمونه فرآورده دارویی با نام Ardeyhepan و Silymarin 140 von ct آلمان به ترتیب یک مقدار اضافی ۲۸ درصدی و ۱۵ درصدی از مقدار اعلام شده را نشان می‌داد.

نتایج به روش اسپکتروفتومتری

قرص Silymarin 140 Von Ct بر اساس سیلیبین	قرص Ardeyhepan بر اساس سیلیبین	بذر خارمریم داخلی با الکل ۹۶ درصد v/v بر اساس سیلیبین w/w	بذر خار مریم داخلی با حلال متانول بر اساس سیلیبین w/w	بذر خار مریم داخلی با حلال استون بر اساس سیلیبین w/w	بذر خارمریم وارداتی با حلال متانول بر اساس سیلیبین w/w
۱۶۱ Mg	۱۲۸ mg	۱/۶ ٪	۱/۵۵ ٪	۱/۷ ٪	۲/۳ ٪

نتایج به روش HPLC

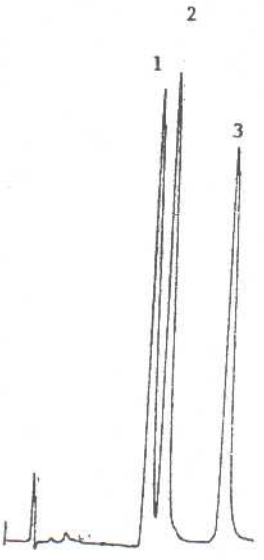
Silymarin 140 von Ct بر اساس مجموع سیلی‌دیانین و سیلی‌کریستین	Ardeyhepan بر اساس مجموع سیلی‌دیانین و سیلی‌کریستین	بذر خار مریم وارداتی بر اساس مجموع سیلی‌دیانین و سیلی‌کریستین w/w
۹۲ mg	۵۷ mg	۱ ٪



20	40	60	80	100	120
0.6487	1.3207	2.0138	2.8909	3.3069	4.0445
0.6402	1.3128	1.9903	2.8965	3.3083	4.0998
0.637	1.3281	2.068	2.8293	3.3427	4.0382
0.642	1.3205	2.024	2.8722	3.3192	4.0608

غلظت (میکروگرم بر میلی‌لیتر)

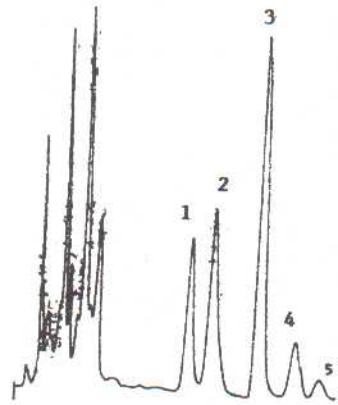
شکل شماره ۱ – منحنی استاندارد مخلوط سیلی دیانین و سیلی کریستین



شکل شماره ۲: HPLC سیلی دیانین و سیلی کریستین Roth و استاندارد داخلی

جدول شماره ۱: میزان ترکیبهای سیلی دیانین و سیلی کریستین Roth و استاندارد داخلی

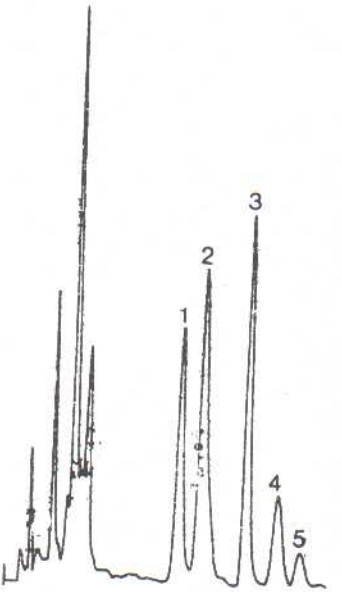
ردیف	نام ترکیب	زمان بازداری	سطح زیر پیک
۱	Silicristin	۱۰/٤٦	۱٦۱۱٥۰۱
۲	Silidianin	۱۱/٦۳	۱۸۱۱۰۳۳
۳	α - naphtol	۱٦/۳٤	۱٦۱٥۳٦۷



شکل شماره ۳: HPLC بذر خار مریم داخلی

جدول شماره ۲: میزان ترکیبهای موجود در بذر خار مریم داخلی

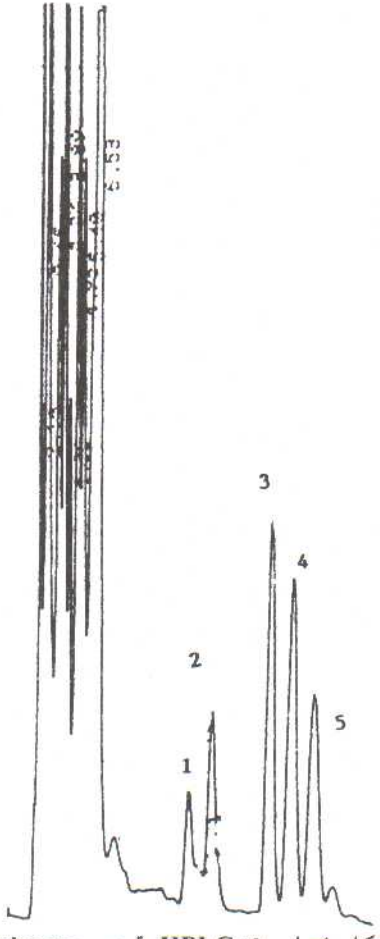
ردیف	نام ترکیب	زمان بازداری	سطح زیر پیک
۱	Silicristin	۱۳/٤۸	٥۱۰٤۱٦
۲	Silidianin	۱٥/۱۱	۱۰٦٤۰۰۸
۳	α - naphtol	۱۹/٤٤	۱۸۱٦۱۸۷
٤	Silibin	۲۱/۰۸	۲۰۲۱۰۳٦
٥	Silibin	۲۲/۷۷	۱٥۹۳۱۸۸



شکل شماره ٤: HPLC بذر خار مریم وارداتی

جدول شماره ۳: میزان ترکیبهای بذر خار مریم وارداتی

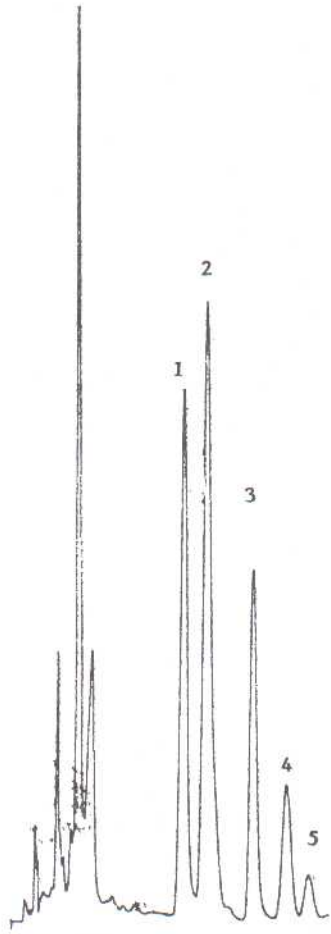
ردیف	نام ترکیب	زمان بازداری	سطح زیر پیک
۱	Silicristin	۱۳/۰۰	۷۱۸۰۷۱
۲	Silidianin	۱٤/٦۹	۱۰۸۹۸۰۱
۳	α - naphtol	۱۸/۱۸	۱٥۳۷۳٦۷
٤	Silibin	۲۰/۷۷	۳۳۹٥٥٦
٥	Silibin	۲۲/٥۳	۱۱٦۱۹۸



شکل شماره ٥: HPLC قرص Ardeyhepan

جدول شماره ٤: میزان ترکیبهای قرص Ardeyhepan

ردیف	نام ترکیب	زمان بازداری	سطح زیر پیک
۱	Silicristin	۱۲/۸٤	۱۱۳٥۳۱٦
۲	Silidianin	۱٤/٥	۱۸٥۲۰۳۸۲
۳	α - naphtol	۱۸/۰۱	۱٥٥۰۸٦٥
٤	Silibin	۲۰/٤٤	٥۱۹۳۷۹
٥	Silibin	۲۲/۱۷	۱۸۲۲۰۷



شکل شماره ٦: HPLC قرص Silymarin 140 von ct

جدول شماره ۵: میزان ترکیبهای قرص Silymarin 140 von ct توسط HPLC

ردیف	نام ترکیب	زمان بازداری	سطح زیر پیک
۱	Silicristin	۱۲/۹۵	۲۲۵٤۱۳۲
۲	Silidianin	۱٤/٦٥	۳۳۳۸۰۰٦
۳	α - naphtol	۱۸/۱٤	۱٤٦٦۷٥٦
٤	Silibin	۲۰/٦۹	۸۰۱۷۷۳
٥	Silibin	۲۰/٤٤	۲٤۳۳۸۹

منابع

زرگری، ع، ۱۳۷۰، *Silybum marianum*، گیاهان دارویی، مؤسسه چاپ و انتشارات دانشگاه تهران، جلد ۳، صفحات ۳۸-۳۵.

- Fintelmann, V. and Weiss, R.F. 2000. Herbal Medicine, Second Edition, 109-111
- Blumenthal, M . Goberg,A .and Brinckmann, 2000, J. 2000. Herbal Medicine Expanded Commission E- Monographs,257-261.
-Wagner. H. and Bladt, S. 1996. Plant Drugs Analysis, Second Edition 234.
- Steinigen,M.1983.Vergleichende Untersuchung Von Silymarinhaltigen Fertigarzueimi tteln. *Pharmazeutische Zeitung*, **128**: 783
- Rajasekaran , A . Kumar, M. Jayakar, B. 1997. HPLC Determination of Silymarin and Its Pharmaceutical Preparations. *The Eastern Pharmacist*, **40** :31
- Wagner, H and Tittel , *G,* 1977. Quantitative Bestimmung Von Silymarin AUS Silybum Marianum Durch Hochleistungesflussigchromatographie., *J Chromatogr*,**135**:499
- The German Pharmacopiea 10(DAB10), 1997:563.
- PDR for Herbal Medicine, Second Edition,part2, 2000:516-518

Identification and Quantitative Determination of Silymarin in *Silybum marianum* and its pharmaceutical preparations

G. Haghi[1] and M. Pirali[2]

Abstract

The bienial milk-thistle belongs to the compositae family, with two meters height. The plant self-grows in road-sides and abandoned grounds in northern areas of Iran. The plant seeds are used for preventing and treatment of hepatic disorders. Its active components are comprised silibinin, silicristin and silidianin isomers, formerly called silymarin. Silymarin have antitoxic effect.

The plant seeds were collected in summer 2000 from Isfahan country-side Barij Essence Co. Research farm. The silymarin of seed and several other pharmaceutical preparations were extracted using suitable solvent and were studied with HPLC and TLC methods, and compared with standard material.

Quantitative determination of silymarin was performed by spectrophotometry and HPLC using internal standard method. The effect of various solvents on the efficincy of extracting silymarin was also studied. Spectrophotometry results were found which only total amount of isomers could be determined by spectrophotometry while all components of silymarin mixture would be determined by HPLC. Silymarin (Roth Co.) used as the standard substance and alpha naphtol as internal standard one.

The amount of silymarin in two domestic seed samples was 1.5% while it was 2.3% in an imported one. In a group of German made Ardeyhepan and Silymarin 140 von ct Sample tablets, 128 mg and 161 mg silymarin was observed respectively which was 28% and 15% more than proposed quantity.

Key Words: *Silybum marianum,* silibinin, silicristin and silidianin isomers

1 - Research and development of Barij Essence Co.

2 - College of Medicinal, Tehran University