

CHROM. 10,644

HOCHLEISTUNGSFLÜSSIGCHROMATOGRAPHIE VON SILYMARIN

II. QUANTITATIVE BESTIMMUNG VON SILYMARIN AUS *SILYBUM MARIANUM* DURCH HOCHLEISTUNGSFLÜSSIGCHROMATOGRAPHIE

G. TITTEL und H. WAGNER

Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München, München (B.R.D.)

(Eingegangen am 14. Oktober 1977)

SUMMARY

High-performance liquid chromatography of silymarin. II. Quantitative determination of silymarin from Silybum marianum by high-performance liquid chromatography

The separation of the genuine silymarin, consisting of silybin, silydianin and silychristin, from the fruits of *Silybum marianum* Gaertn. has been achieved by high-performance liquid chromatography (HPLC) using reversed-phase systems with methanol-water-acetic acid (40:60:5). The separation can be used for a direct quantitative estimation utilizing 1-naphthol as internal standard. The HPLC determination permits individual estimations of silybin, silychristin, silydianin, and in addition the flavanonol taxifolin. This method can be used for routine quantitative analysis of silymarin in crude extracts and pharmaceutical preparations.

EINFÜHRUNG

Die hochleistungsflüssigchromatographische (HPLC) Trennung von natürlich vorkommenden Polyphenolen wurde bisher sowohl auf Reversed-phase-Systemen als auch auf Kieselgelen mit Amino- oder Cyano-Phasen beschrieben. Wulf und Nagel¹ beschrieben die Trennung von Flavonoiden, Court² die Polyphenole aus *Nicotiana tabaccum* und Hoefler und Coggon³ die Polyphenole des schwarzen Tees. Aus Grapefruitsaft trennten Fisher und Wheaton⁴ Naringin und Naringenin-7- β -rutinosid. Von Schwarzenbach⁵ und später von Fisher⁶ wurde die Trennung des als Zuckerersatzstoff diskutierten Neohesperidin-dihydrochalkon mittels HPLC beschrieben. Auf Kieselgelen mit Aminophasen trennten Becker *et al.*⁷ isomere Flavon-C-glykoside. Die HPLC-Analyse von natürlich vorkommenden Xanthonen wurde von Hostettmann und McNair⁸ durchgeführt. Im Rahmen von Untersuchungen über Flavonoide aus den Nadeln von verschiedenen Larixarten berichteten Niemann und Koerselmann-Kooy⁹ über ihre HPLC-Ergebnisse.

Da das antihepatotoxisch wirksame Silymarin, bestehend aus den Isomeren Silybin, Silydianin und Silychristin, aus Mariendistelfrüchten (*Silybum marianum* Gaertn./*Cardui mariae* Fruct. DAB 7, 2. Nachtrag 1975) von aktueller therapeutischer Bedeutung ist und die Silybum-Droge als Monographie in das Europäische Arznei-

buch aufgenommen werden wird, war eine einfachere und schnellere Wertbestimmungsmethode als die bisher ausgearbeiteten¹⁰ im Mikromasstab wünschenswert. Über die Trennung der Einzelverbindungen Silybin, Silydianin und Silychristin mittels HPLC auf Reversed-phase wurde von uns kürzlich berichtet¹¹.

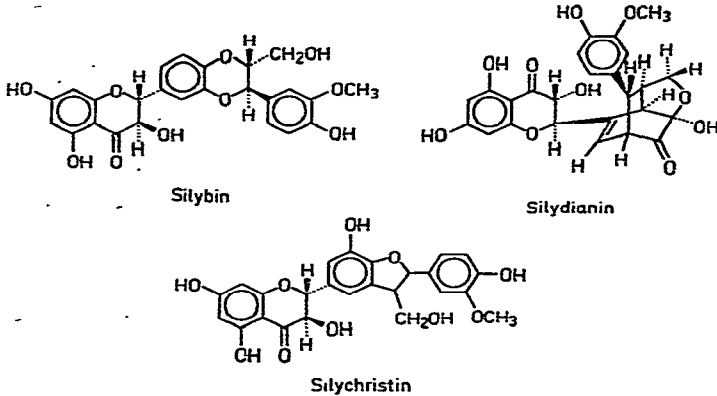


Fig. 1. Strukturformeln der Silymarin-Isomeren.

EXPERIMENTELLES UND ERGEBNISSE

Nachtrag zur ersten Mitteilung¹¹

Der nach Silybin im Chromatogramm der Fig. 2 eluierte Peak (X/Y) ist nicht, wie von uns zunächst angenommen, Dehydrosilybin. Neuere Untersuchungen haben ergeben, dass Dehydrosilybin direkt nach Silybin eluiert und unter den gegebenen Bedingungen nur sehr schlecht davon abgetrennt wird. Bei Durchflussraten um 1.0 ml/min oder bei der später noch erwähnten weiteren Optimierung des Systems mit Ameisensäure ist aber eine Trennung zu erzielen. Bei dem im Chromatogramm der Fig. 2 mit X/Y bezeichneten Peak handelt es sich vermutlich um Silymarinoligomere (Silymarin P)¹². Es ist nicht auszuschliessen, dass Dehydrosilybin und Silymarinoligomere Artefakte sind, die während der Isolierung entstehen.

Quantitative Auswertung der Trennung

Unter den bereits genannten Standardbedingungen¹¹ haben wir zwei Silybum-Drogen verschiedener Herkunft und Arzneifertigpräparate untersucht. Die Bestimmungen wurden nach der Methode des inneren Standards durchgeführt. Als Standardsubstanz wählten wir: 1-Naphthol, da es bei 280 nm im UV absorbiert und die Retentionszeit zwischen Silydianin und Silybin am günstigsten Platz im Chromatogramm liegt. Dies gilt bei Verwendung einer μ Bondapak[®]-C₁₈-Säule (Waters Assoc., Frankfurt/M, B.R.D.). Nimmt man jedoch zur Trennung die chemisch gebundene C₁₈-Phase der Fa. Merck, Darmstadt, B.R.D. (LiChrosorb[®] RP-18), so bleibt zwar die eigentliche Silymarintrennung gleich, das 1-Naphthol aber ändert seine Retentionszeit und erscheint erst am Ende der Trennung zu einem ungünstigeren Zeitpunkt (Tabelle I). 1-Naphthol ist daher auf LiChrosorb-RP-18-Säulen nur bedingt als Standardsubstanz verwendbar. Für diese Trennphase schlagen wir daher *o*-Kresol als inneren Standard vor.

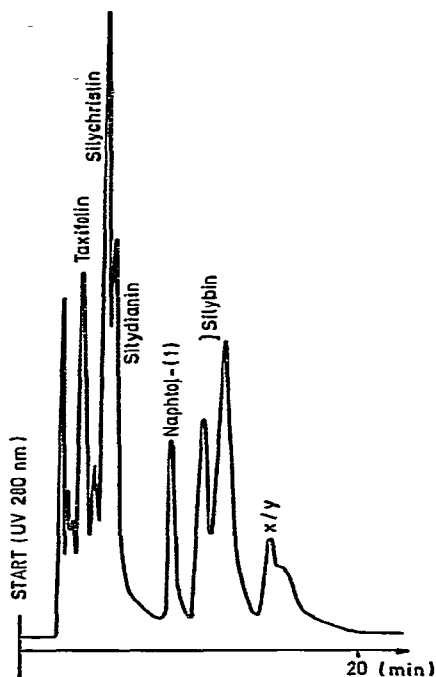


Fig. 2. Chromatogramm eines Methanolextraktes aus *Silybi mariae* Fructus. Säule: μ Bondapak C_{18} ; Eluent: Methanol-Wasser-Eisessig (40:60:5); Durchflussrate: 2.0 ml/min.

Eine weitere Optimierung der Trennung gelang uns durch Ersatz der Essigsäure durch Ameisensäure. Dabei erhöhte sich die Analysenzeit um das Doppelte bei gleicher Durchflussrate. Da aber mit dieser Säure wegen ihrer korrosiven Aggressivität im Dauerbetrieb der Flüssigkeitschromatograph und die Säule stark belastet werden, haben wir weiterhin Eisessig als Laufmittelzusatz verwendet.

Die Auswertung der Chromatogramme haben wir per Hand über die Peakhöhen durchgeführt. Da durch die kurze Analysenzeit scharfe Peaks erhalten werden, ist diese Methode gut anwendbar. Wie Bakalyar und Henry¹³ gefunden haben, ist die Genauigkeit des Ergebnisses abhängig von der konstanten Zusammensetzung des

TABELLE I

RELATIVE RETENTIONSZEITEN DER EINZELVERBINDUNGEN AUS SILYMARIN
Durchflussrate: 2.0 ml/min.

Komponente	<i>l</i> -Naphthol		<i>o</i> -Kresol
	μ Bondapak C_{18}	LiChrosorb RP-18	LiChrosorb RP-18
Taxifolin	0.35	0.15	0.40
Silychristin	0.50	0.21	0.61
Silydianin	0.57	0.25	0.69
Silybin (A)	1.16	0.51	1.61
Silybin (B)	1.32	0.58	1.81

Eluenten. Dies wiederum ist im vorliegenden Fall einer Reversed-phase-Chromatographie leicht möglich.

Die manuelle Auswertung über die Peakflächen war wegen des nur geringen Unterschieds im Retentionsverhalten bei einer Durchflussrate von 2.0 ml/min von Silychristin und Silydianin nur mit Fehlern möglich.

Bei Verdoppelung der Analysendauer durch Erniedrigung der Durchflussrate wurde auch die manuelle Flächenauswertung wegen der besseren Auflösung der Trennung ermöglicht.

Die quantitative Analyse umfasst die Einzelbestimmungen von Silybin, Silydianin und Silychristin und ausserdem von Taxifolin. Durch Addition dieser vier Werte ergibt sich der Gehalt an Silymarin zuzüglich Taxifolin.

Als Standardkorrekturfaktoren haben wir auf μ Bondapak C₁₈ die in Tabelle II angegebenen Werte ermittelt.

TABELLE II

STANDARKORREKTURFAKTOREN AUF μ BONDAPAK C₁₈, BEZOGEN AUF 1-NAPHTHOL

<i>Komponente</i>	<i>Korrekturfaktor</i>
Taxifolin	2.16
Silychristin	1.15
Silydianin	0.71
Silybin	0.62

Da sich Silybin unter den von uns gewählten Bedingungen der HPLC in zwei Peaks aufspaltet, müssen beide einzeln ausgewertet und dann addiert werden. Der Korrekturfaktor bezieht sich auf das "Gesamt-Silybin". Die beiden Silybin-Signale traten sowohl bei der Untersuchung der Reinsubstanz wie auch in Drogenextrakten und in Arzneimittelauszügen auf. Die Säure im Laufmittelgemisch hat dabei keinen Einfluss auf dieses Ergebnis, da das gleiche Eluentgemisch ohne Essigsäure ebenfalls die Aufspaltung ergibt.

Versuche, die von uns im Chromatogramm mit A und B bezeichneten Peaks präparativ zu isolieren, sind im Gange.

Bestimmung der Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze für Silybin wurde für UV-Detektion (280 nm) bei höchster Empfindlichkeit des eingesetzten Photometers (Altex 151, range 0.05) mit 82 ng gefunden. Das Signal-Rauschverhältnis betrug 4:1.

Quantitative Bestimmung des Silymaringehaltes in Fructus Silybi mariae Gaertn.

Getrocknete Droge (10.0 g) wurde in der Soxhlet-Apparatur durch vierstündiges Erhitzen mit ca. 500 ml Petroläther entfettet. Nach Entfernen des Petroläthers wurden zum Drogenrückstand ca. 30 mg 1-Naphthol (genau gewogen) gegeben und etwa 5 h mit Methanol extrahiert. Der Auszug wurde filtriert und davon zwischen 7 und 10 μ l bei gesteigerter Detektorempfindlichkeit direkt in den Liquidchromatographen eingespritzt. In Tabelle III sind die Ergebnisse der Drogenuntersuchungen wiedergegeben.

TABELLE III
SILYMARINGEHALT IN GETROCKNETEN DROGEN

Komponente	Droge A (10.0 g)		Droge B (25.0 g)		Vergleichswerte* (%)
	Gehalt		Gehalt		
	%	mg	%	mg	
Silybin	1.13	113.7	1.44	360.1	1.22
Silydianin	0.76	76.8	0.57	144.9	0.32
Silychristin	0.73	73.5	0.78	197.0	0.59
Taxifolin	0.23	23.0	0.15	39.5	0.28
Gesamtgehalt	2.85	287.0	2.94	741.5	2.41

* Die Vergleichswerte wurden nach der von Wagner *et al.*¹⁰ beschriebenen Methode ermittelt.

Ausser der Frischdroge wurde auch ein mit Silymarin angereicherter Trockenextrakt geprüft. Der Extrakt war in Methanol direkt löslich und wurde nach Filtration direkt in den Flüssigkeitschromatographen eingespritzt. Das Ergebnis ist in Tabelle IV festgehalten.

TABELLE IV
ANGEREICHERTER SILYMARINTROCKENEXTRAKT

Silymarin und Taxifolin aus 3000 mg Extrakt.

Komponente	HPLC		DC-Vergleichswerte ¹⁰ (%)
	%	mg	
Silybin	26.65	801.3	33.2
Silydianin	18.21	547.6	12.4
Silychristin	13.35	401.5	15.9
Taxifolin	6.44	193.8	6.8
Gesamtgehalt	64.65	1944.2	68.3

Quantitative Bestimmung des Silymaringehaltes in Arzneifertigpräparaten (Tabelle V)

Dragées (10 g) oder Kapseln wurden gepulvert bzw. geöffnet und zusammen mit 100 mg 1-Naphthol (genau gewogen) 1 h am Rückfluss mit ca. 300 ml Methanol erhitzt. Der Auszug wurde filtriert und von der klaren Lösung ohne Konzentrierung ca. 5–10 µl direkt eingespritzt.

TABELLE V
SILYMARIN-GEHALT (mg) IN ARZNEIFERTIGPRÄPARATEN

Komponente	Präparat A		Präparat B	
	HPLC	DC*	HPLC	DC*
Silybin	27.41	31.20	21.08	24.4
Silydianin	19.56	13.50	8.29	7.2
Silychristin	14.53	13.50	15.76	10.8
Taxifolin	2.80	6.30	1.66	6.0
Gesamtgehalt (= Gehalt pro Dosis)	64.30	64.50	46.79	48.4
Gesamtgehalt Silymarin zuzüglich Taxifolin in % bezogen auf die deklarierte Menge	91.86	92.14	66.84	69.14

* Die Vergleichswerte wurden nach der von Wagner *et al.*¹⁰ beschriebenen Methode der DC-Direktauswertung bestimmt.

DISKUSSION

Insgesamt wurden zwei Drogen (*Silybi mariae* Fructus) unterschiedlicher Herkunft, ein angereicherter Silybum-Trockenextrakt und zwei Arzneifertigpräparate untersucht. In allen Fällen waren die drei für die Wirksamkeit verantwortlichen Isomeren Silybin, Silydianin, Silychristin zuzüglich Taxifolin nachweisbar. Die beste chromatographische Trennung war bei den Drogen zu erhalten.

Die Qualität der Drogen war mit 2.8–2.9% Gesamtgehalt im Bereich der von Diesel¹² mittels fluorometrischer DC-Direktauswertung gefundenen Werte. Der Gehalt lag über dem vom DAB 7 geforderten Mindestgehalt von 1% Silymarin, berechnet als Silybin.

Einige der Bestimmungen wurden nach der von Wagner *et al.*¹⁰ beschriebenen Methode der DC-Direktauswertung parallel überprüft und verglichen. Dabei ergaben sich gute Übereinstimmungen in den Gesamtergebnissen. Die Unterschiede schwankten zwischen 0.4–2.7%.

Größere Unterschiede traten bei den Einzelwerten der verschiedenen Silymarin-Isomeren auf. Ausserdem waren bei Taxifolin grössere Abweichungen zu beobachten. Durch weitere Untersuchungen müssen die nicht immer regelmässig auftretenden Abweichungen geklärt werden.

Im Gesamtergebnis kann somit die HPLC-Methode mit der DC-Direktauswertung verglichen werden. Der Vorteil der HPLC kann in der grossen Schnelligkeit gesehen werden.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Trennung von Silymarin aus den Früchten von *Silybum marianum* Gaertn. in Silybin, Silydianin und Silychristin gelingt mittels HPLC auf Reversed-phase Systemen mit Methanol-Wasser-Eisessig (40:60:5). Die Trennung ist über 1-Naphthol als innerer Standard direkt quantitativ auswertbar. Die HPLC-Gehaltsbestimmung erfasst einzeln Silybin, Silychristin und Silydianin sowie das Flavanonol Taxifolin. Sie kann zur quantitativen Bestimmung von Silymarin in Rohextrakten und pharmazeutischen Zubereitungen verwendet werden.

LITERATUR

- 1 L. W. Wulf und C. W. Nagel, *J. Chromatogr.*, 116 (1976) 271.
- 2 W. A. Court, *J. Chromatogr.*, 130 (1977) 287.
- 3 A. C. Hoefler und Ph. Coggon, *J. Chromatogr.*, 129 (1976) 460.
- 4 J. F. Fisher und T. A. Wheaton, *J. Agr. Food Chem.*, 24 (1976) 898.
- 5 R. Schwarzenbach, *J. Chromatogr.*, 129 (1976) 31.
- 6 J. F. Fisher, *J. Agr. Food Chem.*, 25 (1977) 682.
- 7 H. Becker, G. Wilking und K. Hostettmann, *J. Chromatogr.*, 136 (1977) 174.
- 8 K. Hostettmann und H. M. McNair, *J. Chromatogr.*, 116 (1976) 201.
- 9 G. J. Niemann und J. W. Koerselmann-Kooy, *Planta Medica*, 31 (1977) 297.
- 10 H. Wagner, P. Diesel und M. Seitz, *Arzneim.-Forsch.*, 24 (1974) 466.
- 11 G. Tittel und H. Wagner, *J. Chromatogr.*, 135 (1977) 499.
- 12 P. Diesel, *Dissertation*, Ludwig-Maximilians-Universität, München, 1974.
- 13 St. R. Bakalyar und R. A. Henry, *J. Chromatogr.*, 126 (1976) 327.