

ИССЛЕДОВАНИЕ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

РАСТВОРИМОСТЬ СИЛИМАРИНА В НЕКОТОРЫХ ТРИГЛИЦЕРИДАХ И ДЕТЕРГЕНТАХ

Бутенко С.С., Лукашов Р.И.

*Белорусский государственный медицинский университет,
г. Минск, Беларусь
s.butenka@yandex.by*

Аннотация. Изучена растворимость силимарина и индивидуальных флаволигнанов в ряду 10 триглицеридов (триацетин, каприновый/каприловый триглицерид (ККТГ), подсолнечное, кукурузное, рапсовое, оливковое, пальмовое, пальмоядровое, кокосовое и какао масла) и 6 детергентов (ТВИН-20, ТВИН-40, ТВИН-60, ТВИН-80, 35-ПЭГ касторовое масло (35-ПЭГ КМ) и 40-ПЭГ гидрированное касторовое масло (40-ПЭГ ГКМ)).

Ключевые слова: триглицериды, детергенты, растворимость, экстракт расторопши пятнистой, флаволигнаны, силимарин, силибинин, изосилибинин, силидианин, силикрестин.

SOLUBILITY OF SILYMARINE IN SOME TRIGLYCERIDES AND DETERGENTS

Butenka S.S., Lukashou R.I.

*Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus
s.butenka@yandex.by*

Abstract. The solubility of silymarin and its individual flavonolignans (silibinin, isosilibinin, silydianin and silychristin) was determined in a series of 10 triglycerides (triacetin, capric/caprylic triglycerides (CCTG), sunflower, corn, rapeseed, olive, palm, palm kernel, coconut oils and cocoa butter) and 6 detergents (TWEEN-20, TWEEN-40, TWEEN-60, TWEEN-80, 35-PEG castor oil (35-PEG CO) and 40-PEG hydrogenated castor oil (40-PEG HCO)).

Key words: triglycerides, detergents, solubility, milk thistle extract, flavolignans, silymarin, silibinin, isosilibinin, silydianin, silicristin.

Введение. В последние годы ведется активный поиск соединений, обладающих гепатопротекторными свойствами. В научной литературе описывается большое количество таких соединений [1]. В отличие от многих других соединений, претендующих на эту роль, флаволигнаны расторопши пятнистой (силимарин) обладают доказанными гепатопротекторными свойствами [2-4]. Кроме гепатопротекторной активности силимарин обладает широким спектром других фармакологических свойств [5-6].

Не смотря на такое разнообразие свойств, на мировом фармацевтическом рынке силимарин представлен только двумя лекарственными формами. Это

сухой экстракт расторопши пятнистой для перорального применения, представленный такими продуктами, как LEGALON (Madaus) и его аналоги, и, силибинина гемисукцинат динатриевая соль – водорастворимая форма для внутривенного применения (LEGALON-SIL, Madaus).

Кроме того, силимарин в виде сухого экстракта обладает очень низкой растворимостью в воде при физиологических рН, и, как следствие, очень низкой биодоступностью [7].

В литературе описано большое количество способов повышения биодоступности силимарина [8], но информация о физико-химических свойствах силимарина очень разрознена и представлена очень скупо. Даже в таких базах данных, как PubChem [9] и DrugBank Online [10] физико-химические свойства силимарина представлена только оценочными, теоретически вычисленными, а не экспериментальными данными.

Цель работы – заполнить недостающие пробелы в экспериментальных данных. В данной работе изучена растворимость силимарина и индивидуальных флаволигнанов в линейке из 10 триглицеридов (триацетин, каприловые/каприновые триглицериды (ККТГ), кукурузное масло, подсолнечное масло, рапсовое масло, оливковое масло) при 25°C и (масло какао, кокосовое масло, пальмовое масло, пальмоядровое масло) при 37°C, и линейке из 6 детергентов (ТВИН-20, ТВИН-40, ТВИН-60, ТВИН-80, 35-ПЭГ касторовое масло (35-ПЭГ КМ) и 40-ПЭГ гидрированное касторовое масло (40-ПЭГ ГКМ)) при 37°C.

Материалы и методы

Материалы и оборудование. Сухой экстракт расторопши пятнистой с содержанием силимарина 50,0 – 60,0 % (INDENA S.p.A., Италия). Все триглицериды квалификацией не ниже «рафинированный, дезодорированный», все детергенты квалификацией не ниже «чда», сухой экстракт расторопши аналитический стандарт Европейской Фармакопеи, высокоэффективный жидкостной хроматограф с диодно-матричным детектором Agilent 1100 под управлением ChemStation for LC 3D systems Rev. B.04.03-SP1 (108) (Agilent Technologies, США), термошейкер TS-100 (BioSan, Латвия).

Определение растворимости в триглицеридах. Для определения растворимости использовали стандартный метод «встряхиваемой колбы». В пластиковые пробирки с укупоривающимися пробками типа «Эппендорф» вносили избыток сухого экстракта расторопши пятнистой и 2,0 мл соответствующего триглицерида, пробки укупоривали и инкубировали на лабораторном термошейкере при 900 об/мин и 25,0°C или 37,0°C в течение 48,0 ч, центрифугировали при 10'000 g в течение 30 мин. Надосадов в количестве 1 г интенсивно перемешивали с 2 мл ацетонитрила и 4 мл гептана. После расслаивания смеси в течение 15 мин отбирали для хроматографического анализа аликвоту из нижнего ацетонитрильного слоя.

Определение растворимости в детергентах. Для определения растворимости использовали стандартный метод «встряхиваемой колбы». В пластиковые пробирки с укупоривающимися пробками типа «Эппендорф»

вносили избыток сухого экстракта расторопши пятнистой и 2,0 мл соответствующего детергента, пробки укупоривали и инкубировали на лабораторном термошейкере при 900 об/мин и 25,0°C или 37,0°C в течение 48,0 ч, центрифугировали при 10'000 g в течение 30 мин. Надосадок в количестве 1 г растворяли в 10 мл метанола (в случае 40-ПЭГ ГКМ в качестве растворителя использовали диметилацетамид).

Хроматографическое определение. Количественное определение силимарина и индивидуальных флаволигнанов проводили методом ВЭЖХ по фармакопейной методике [11] с изменениями. Разделение проводили на хроматографической колонке WATERS XBridge C18 (4,6x100 мм, 3,5 мкм) при 30°C. Бинарная система элюентов состояла из 0,1 % раствора муравьиной кислоты в воде (А) и 0,1 % раствора муравьиной кислоты в метаноле (В). Условия элюирования были следующие: 0 мин, 36,5 % В; 9,0 – 10,0 мин, 50,0 % В; уравнивание системы 10,1 – 15,0 мин. Скорость потока подвижной фазы была 1,5 мл/мин и детектирование проводилось при 288 нм.

Результаты и обсуждение

Поскольку гепатопротекторной активностью обладают все флаволигнаны и промышленность производит силимарин в виде сухого экстракта с массовой долей порядка 50 %, было принято решение не выделять отдельные флаволигнаны из смеси, а изучать растворимость силимарина *as is* в смеси. Растворимость в каждом растворителе изучали в квартетах, контролировали содержание осадков на наличие всех компонентов смеси. Растворимость в триглицеридах при 25°C представлена в таблице 1, при 37°C – в таблице 2.

Из полученных результатов видно, что растворимость индивидуальных флаволигнанов в триглицеридах уменьшается в ряду силибинины А + В > силикристин ≈ изосилибинины А + В > силидианин.

В то же время, растворимость индивидуальных флаволигнанов очень сильно зависит от состава триглицеридов, уменьшаясь с ростом длины жирнокислотных остатков.

Так, максимальная растворимость наблюдается в триацетине, состоящем из С2:0 кислот. Растворимость на порядок падает в ККТГ, состоящем из смеси С8:0/С10:0 жирных кислот. И опять на порядок падает в маслах (подсолнечное, кукурузное, рапсовое, оливковое), состоящих в основном из смеси С16:0/С18:0/С18:1/С18:2 жирных кислот.

Различие растворимости в маслах какао, кокосовом, пальмовом и пальмоядровом также хорошо коррелирует с жирнокислотным составом этих масел.

Так, максимальная растворимость наблюдается в кокосовом масле (фракция С8:0/С10:0 – 10–17 %; фракция С12:0/С14:0 – 59–72 %; фракция С16:0/С18:1 – 13-20 %), меньшая растворимость наблюдается в пальмоядровом масле (фракция С8:0/С10:0 – 4–11 %; фракция С12:0/С14:0 – 55–73 %; фракция С16:0/С18:1 – 20-39 %), минимальная – в пальмовом и масле какао (С16:0/С18:0/С18:1 – 100 %)

Растворимость в детергентах при 37°C представлена в таблице 3.

Из полученных результатов видно, что растворимость индивидуальных флаволигнанов уменьшается в ряду силибинина А + В > силикристина > изосилибинина А + В > силидианина.

В то же время растворимость индивидуальных флаволигнанов остается практически постоянной в ряду ТВИНов и ПЭГ КМ, то есть, растворимость не зависит от природы жирнокислотного хвоста (С12:0 – С18:1) и длины полиоксиэтиленового хвоста.

Таблица 1

Растворимость индивидуальных флаволигнанов в триглицеридах при 25°C, мг/г (Р = 95 %, n = 4)

№ п.п.	Триглицериды	Силикристин	Силидианин	Силибинин А+В	Изосилибинин А+В	Силибин
1.	Триацетин	8,3±0,5	2,0±0,1	5,9±0,3	4,1±0,4	20,2±1,3
2.	ККТГ	0,71±0,01	0,21±0,01	1,25±0,04	0,50±0,01	2,7±0,0
3.	Подсолнечное масло	0,040±0,002	0,015±0,001	0,17±0,00	0,045±0,002	0,27±0,01
4.	Кукурузное масло	0,048±0,007	0,017±0,001	0,17±0,02	0,052±0,006	0,29±0,03
5.	Рапсовое масло	0,043±0,001	0,016±0,001	0,15±0,00	0,044±0,001	0,25±0,01
6.	Оливковое масло	0,033±0,001	0,012±0,000	0,12±0,01	0,035±0,004	0,20±0,01

Таблица 2

Растворимость индивидуальных флаволигнанов в триглицеридах при 37°C, мг/г (Р = 95 %, n = 4)

№ п.п.	Триглицериды	Силикристин	Силидианин	Силибинин А+В	Изосилибинин А+В	Силибин
1.	Пальмовое масло	8,3±0,5	2,0±0,1	5,9±0,3	4,1±0,4	20,2±1,3
2.	Пальмоядровое масло	0,71±0,01	0,21±0,01	1,25±0,04	0,50±0,01	2,66±0,04
3.	Кокосовое масло	0,040±0,002	0,015±0,001	0,17±0,00	0,045±0,002	0,27±0,01
4.	Масло какао	0,048±0,007	0,017±0,001	0,17±0,02	0,052±0,006	0,29±0,03

Таблица 3

Растворимость индивидуальных флаволигнанов в детергентах при 37°C, мг/г (Р = 95 %, n = 4)

№ п.п.	Триглицериды	Силикристин	Силидианин	Силибинин А+В	Изосилибинин А+В	Силибин
1.	ТВИН-20	11,8±0,5	2,5±0,1	30,6±1,1	5,9±0,3	50,8±1,8
2.	ТВИН-40	11,8±0,3	2,6±0,0	30,7±0,7	5,9±0,1	51,0±1,1
3.	ТВИН-60	10,3±1,0	2,3±0,4	26,7±2,4	5,3±0,4	44,6±4,2
4.	ТВИН-80	10,6±0,6	2,4±0,1	27,9±1,4	5,5±0,2	46,3±2,3
5.	35-ПЭГ КМ	8,5±0,6	1,9±0,2	21,5±1,6	4,3±0,3	36,2±2,6
6.	40-ПЭГ ГКМ	9,9±0,5	2,2±0,2	24,4±1,6	4,4±0,3	40,9±2,3

Заключение

Растворимость индивидуальных флаволигнанов и силибинина, как суммы всех флаволигнанов, зависит от длины жирнокислотного хвоста триглицеридов, и максимальна в триацетине (для силибинина при 25°C равна 20,2±1,5 мг/г),

уменьшается на порядок в ККТГ (для силибинина при 25°C равна 2,7±0,0 мг/г) и опять уменьшается на порядок в природных растительных маслах (для силибинина при 25°C равна 0,25±0,03 мг/г).

Растворимость индивидуальных флаволигнанов в природных растительных маслах при 25°C колеблется в диапазоне для силикрестина - 0,041±0,007 мг/г, для силидианина - 0,015±0,002 мг/г, для силибининов А + В - 0,15±0,02 мг/г и для изосилибининов А + В - 0,044±0,008 мг/г вне зависимости от происхождения масла.

Растворимость индивидуальных флаволигнанов практически не зависит от длины жирнокислотного и полиоксиэтиленового хвоста в ряду ТВИНов и ПЭГ КМ и при 37°C равна для силикрестина 10,5±1,3 мг/г, для силидианина - 2,3±0,2 мг/г, для силибининов А + В - 27,0±3,7 мг/г и для изосилибининов А + В - 5,2±0,7 мг/г.

В результате растворимость силибинина, как суммы всех флаволигнанов, в ряду ТВИНов и ПЭГ КМ при 37°C равна 45,0±6,0 мг/г.

Полученные результаты можно использовать при разработке новых лекарственных средств на основе флаволигнанов расторопши.

Литература

1. de la Riva, G. A. Known Hepatoprotectors Act as Antioxidants and Immune Stimulators in Stressed Mice: Perspectives in Animal Health Care / G. A. de la Riva, F.J. López Mendoza, G. Guillermin Agüero-Chapin // *Current Pharmaceutical Design*. – 2018. – V. 4, – №. 40, – P. 4825–4837. doi: 10.2174/1381612825666190116151628.

2. de Avelar, C.R. Efficacy of silymarin in patients with non-alcoholic fatty liver disease — the Siliver trial: a study protocol for a randomized controlled clinical trial / C. R. de Avelar, B. V. Coelho Nunes, B. da Silva Sasaki [et al.] // *Trials*. – 2023, – V. 24, № 1, – P. 177–187. doi: 10.1186/s13063-023-07210-6.

3. Kheong, Ch.W. A Randomized Trial of Silymarin for the Treatment of Nonalcoholic Steatohepatitis / Ch.W. Kheong, N. Raihan NM, S. Mahadeva // *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. – 2017, – V. 15, – №.12, – P.1940–1949. doi: 10.1016/j.cgh.2017.04.016.

4. Yang, Z. Effects and Tolerance of Silymarin (Milk Thistle) in Chronic Hepatitis C Virus Infection Patients: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. / Z. Yang, L. Zhuang, Y. Lu [et al.] // *BioMed Research International*. – 2014. – V. 2014. – P. 1–9. doi: 10.1155/2014/941085.

5. Porwal, O. Silybum marianum (Milk Thistle): Review on Its chemistry, morphology, ethno medical uses, phytochemistry and pharmacological activities. / O.Porwal, M. Sheet, E. Tariq AB [et al.] // *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*. – 2019. – V. 9. – №. 5. – P. 199–206. doi: 10.22270/jddt.v9i5.3666.

6. Le, Q.-U. Phytoconstituents and pharmacological activities of Silybum marianum (Milk Thistle): A critical review. / Q.-U. Le, H.-L. Lay, M.-Ch. Wu [et al.] // *American Journal of Essential Oils and Natural Products*. – 2018. – V. 6. – №. 4. – P. 41–47. URL: <https://www.researchgate.net/publication> /

331438694_Phytoconstituents_and_pharmacological_activities_of_Silybum_marianum_Milk_Thistle_A_critical_review (дата обращения: 12.04.2024).

7. Barzaghi, N. Pharmacokinetic studies on IdB 1016, a silybin-phosphatidylcholine complex, in healthy human subjects. / N. Barzaghi, F. Crema, G. Gatti [et al.] // *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. – 1990. – V. 15. – №. 4. – P. 3338. doi: 10.1007/BF03190223.

8. Chen, Zh. A comparative study on the preparation and evaluation of solubilizing systems for silymarin. / Zh. Chen, W. Gao, X. Feng [et al.] // *Drug Delivery and Translational Research*. – 2023 doi: 10.1007/s13346-023-01476-8.

9. PubChem / URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/31553> (дата обращения: 12.04.2024).

10. DrugBank Online / URL: <https://go.drugbank.com/drugs/DB09298> (дата обращения: 12.04.2024).

11. ФС 07/2016:1860 «Расторопши плоды» // Государственная фармакопея Республики Беларусь II издания. Том 2. Молодечно: «Типография Победа», 2016. – С. 1296–1298.



Министерство здравоохранения Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение
высшего образования
«Иркутский государственный медицинский университет»
(ФГБОУ ВО ИГМУ Минздрава России)

Инновационные технологии в фармации

Выпуск 11

Материалы Всероссийской научно-практической конференции с
международным участием

Иркутск, 7 июня 2024 года

Под общей редакцией Е. Г. Приваловой

Иркутск
ИГМУ
2024