

УДК 615.322:582.998.1

**ПОЛУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ИЗ СЕМЯН  
РАСТОРОПШИ ПЯТНИСТОЙ (*SILYBUM MARIANUM* (L.))****А.С. Щекатихина, Т.М. Власова, В.П. Курченко***Белорусский Государственный Университет, Минск, Республика Беларусь***Введение**

Семена расторопши пятнистой (*Silybum marianum* (L.) Gaertn. (Asteraceae)) являются уникальным источником получения различных биологически активных веществ, таких как флаволигнаны: силибин, силимарин, силикристин и их стереоизомеры; флавоноиды: таксифолин, кверцетин, кемпферол; органические кислоты; смолы; жирные кислоты и белки [1]. Именно благодаря наличию флаволигнанов, плоды этого растения нашли широкое применение в фармацевтике в качестве средства лечения различных гепатопатий: острый и хронический вирусный гепатит, цирроз печени, вызванный лекарственными препаратами или токсинами, а также алкогольное поражение печени, болезней селезенки и пищеварительного тракта [2]. В мировой медицинской практике и в нашей стране успешно применяются такие лекарственные препараты как «Легалон» (Германия), «Лепротек» (Сербия и Черногория), «Гепарсил» (Украина), «Силибор» (Украина), «Силиверин» (Польша), «Силимарол» (Польша) и другие. Терапевтическая эффективность препаратов из плодов расторопши пятнистой базируется на нескольких механизмах действия. Силибин стабилизирует мембраны гепатоцитов, повышает синтез белка в печени, обладает антиоксидантной, противовоспалительной и антибактериальной активностью [3]. Нейтрализует свободные радикалы в печени, препятствует разрушению клеточных структур. Специфически стимулирует РНК-полимеразу и активирует синтез структурных и функциональных белков и фосфолипидов в поврежденных гепатоцитах. Стабилизируя клеточные мембраны, предотвращает выход внутриклеточных компонентов (трансаминаз) и ускоряет регенерацию клеток печени. Тормозит проникновение в клетку некоторых гепатотоксических веществ, таких как яд бледной поганки [3]. Предварительные эксперименты на животных показывают, что силимарин может обладать и антираковой активностью, в частности, в отношении рака груди, простаты и кожи [2].

Семена расторопши пятнистой также богаты маслом, содержащим большое количество полиненасыщенных жирных кислот. Лекарственные препараты на основе масла применяются при лечении язв, ран, пролежней и воспалительных процессов [1]. В промышленности его получают методом холодного прессования. Измельченное сырье после прессования (жмых) используют для получения сухого экстракта - силимарина.

Для обеспечения фармацевтической промышленности значительными количествами флаволигнанов из расторопши пятнистой чаще всего используются экстракционные способы выделения. Получаемая субстанция – силимарин, состоит из флаволигнанов: силибинин, силикристин и силидианин, и флавоноида - таксифолина. Значительное количество работ посвящено разделению смеси и анализу свойств изомеров флаволигнанов, однако предлагаемые методы разделения дорогостоящи, трудоемки и не приводят к их полному разделению [1].

Необходимо также отметить, что у различных производителей гепатопротекторных лекарственных средств состав флаволигнанов, входящих в лекарственные формы различается. Эти различия определяются хемотрассами расторопши пятнистой, которые используются для получения силимарина. Нами было показано различия в составе флаволигнанов лекарственных средств различных производителей [4]. В литературе имеются данные о различиях в биологической активности этих изомеров [1]. В связи с этим, существует необходимость получения индивидуальных флаволигнанов (силибина,

силикрестина и силидианина) для проведения углубленных исследований их физико-химических и биологических свойств.

Таким образом, представляется важным провести сравнительный анализ эффективности различных методов выделения и очистки флавоноидов и других биологически активных веществ из семян расторопши пятнистой. Целью нашей работы являлось оптимизация методов получения силимарина, выделение и очистка из него силикрестина, силидианина, силибина, а также изучение компонентного состава масла расторопши пятнистой.

### **Методы исследования**

*Получение силимарина.* Экстракция флаволигнанов из семян расторопши пятнистой проводилась по стандартной методике [1]. Из измельченного сырья флаволигнаны трижды экстрагировали 80% этиловым спиртом при температуре 55-60 °С. Время первой экстракции – 3 ч, второй – 2 ч, третьей – 1ч. Соотношение сырье-экстрагент составило 1:8.

Экстракты смешивали и упаривали в вакууме до 20-25% от первоначального объема. После концентрирования и охлаждения экстракт подвергали двукратной обработке петролейным эфиром. На экстракцию жирных кислот берут растворителя в количестве 20% от объема экстракта. Время каждой экстракции петролейным эфиром составляет 20 мин, отстаивание 30 мин.

Осаждение силимарина из обезжиренного экстракта проводили 0,05% раствором соляной кислоты. Выпавший осадок - силимарин отфильтровывают от маточного раствора, после чего промывают водой до нейтрального рН, и сушат 8-10 часов до постоянной массы при комнатной температуре.

*Исследование компонентного состава масла расторопши пятнистой.* Определение жирных кислот осуществляли по модифицированному методу Welch. Микронавеску образца масла помещали в раствор 2% серной кислоты в абсолютном метаноле, содержащий гептадекановую кислоту C<sub>17:0</sub> (внутренний стандарт). Запаянные в ампулах образцы подвергали метанолизу при 80% для получения метиловых эфиров жирных кислот.

Метиловые эфиры жирных кислот экстрагировали гексаном и определяли методом газожидкостной хроматографии на приборе Hewlett-Packard 4890D, оснащенном плазменно-ионизационным детектором и капиллярной колонкой HP-Innowax 0,32x30м с фазой полиэтиленгликоль 0,5 мкм. Анализ проводили при скорости потока гелия 26 см<sup>3</sup>/сек; температуре колонки 220 °С; инжектора и детектора – 250 °С. Индивидуальные жирные кислоты идентифицировали по времени удержания при разделении стандартных смесей этих веществ и оценивали в процентах от их общего содержания [5].

*Выделение силибина из силимарина путем перекристаллизации.* Силимарин растворяли в абсолютном этаноле при незначительном нагревании. После его полного растворения, добавляли 10% дистиллированной воды и медленно охлаждали. В процессе охлаждения, силибин выпадал в осадок. Чистый силибин получали при последующей рекристаллизации из этанола [6].

*Препаративное получение индивидуальных флаволигнанов.* Индивидуальные флаволигнаны (силибин, силикрестин и силидианин) получали при помощи препаративной колоночной хроматографии. Она проводилась с использованием сорбента Toyopearl HW-75 (колонка 1,6x65 см). В качестве подвижной фазы применялась смесь этилового спирта с водой в соотношении 1:1. Скорость элюирования составляла 7,5 мл/час. Фракции собирались объемом по 1,5 мл. Детекцию проводили при двух длинах волн 290 и 326 нм на спектрофотометре СФ-103 с использованием в качестве холостой пробы 50% этиловый

спирт. На колонку наносился спиртовой раствор силимарина, представляющий собой смесь флаволигнанов, полученный методом описанным ранее.

*Обратно-фазная высоко-эффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ).* Для качественной и количественной оценки содержания биологически активных веществ использовали обратно-фазную ВЭЖХ. ВЭЖХ проводили на жидкостном хроматографе «Agilent 1100», США, с УФ-детектором. Неподвижная фаза: 250x4,6 мм Диасфер С18, Россия, подвижная фаза: метанол-фосфорная кислота (32:68→80:20→32:68) pH=2,3, скорость подачи 1 мл/мин, детектирование УФ-детектором: длина волны 298 нм, Vw=4.

*Тонкослойная хроматография* проводилась на пластинках “Merck Silica gel 60 F<sub>254</sub>”. В качестве системы разделения использовалась смесь хлороформ - ацетон – муравьиная кислота в соотношении 8,82:1,94:1,0. После разделения пластинку фотографировали в ультрафиолете. Для обнаружения флаволигнанов пластинку опрыскивали красителем прочным синим В [2].

### Результаты и обсуждение

В состав плодов расторопши пятнистой, кроме основных биологически активных веществ – флаволигнанов, обладающих гепатопротекторным действием, входят флавоноиды, органические кислоты, горечи, смолы, жирное масло, белки, в состав которых входит полный набор незаменимых аминокислот, фосфолипиды и другие вещества, что дает возможность разработать схему безотходной переработки плодов расторопши. На рисунке 1 представлена схема комплексной переработки семян расторопши пятнистой, в результате которой можно получить силимарин, шрот и масло [1].

## плоды расторопши

### измельчение

(гомогенизация до  
размеров частиц не менее 3

**шрот**

**экстракция**

(петролейный  
эфир)

**масло  
расторопш**

(80% этиловый спирт,  
T=55-60 °C)

**силимарин**

Рисунок 1 – Комплексная переработка плодов расторопши пятнистой

После экстракции флаволигнанов этиловым спиртом и обезжиривания петролейным эфиром остается шрот. В литературе имеют данные о том, что в состав шрота входит полный аминокислотный набор, включая большое содержание незаменимых аминокислот, что повышает его питательную ценность. Поэтому он рекомендуется в качестве белковой кормовой добавки в животноводстве [1].

Масло расторопши, также как и силимарин, широко используется в медицине при лечении различных язвенных болезней. С помощью метода газожидкостой хроматографии был проанализирован жирнокислотный состав масла из расторопши пятнистой. В таблице 1 приведены данные хроматографии в соотнесении их с уже имеющимися литературными данными. Показано, что в состав масла входят такие жирные кислоты, как миристиновая, пальмитиновая, стеариновая, олеиновая, линолевая, арахидиновая и лигноцериновая жирные кислоты.

Таблица 1 – Содержание жирных кислот в масле расторопши пятнистой

Жирная кислота	% от общего содержания	
	в масле расторопши	в масле расторопши [1]
Пальмитиновая (C <sub>16:0</sub> )	19,2	8,9
Стеариновая (C <sub>18:0</sub> )	8,7	4,9
Олеиновая (C <sub>18:1</sub> )	25,6	22,0
Линолевая (C <sub>18:2</sub> )	43,4	61,5
Линоленовая (C <sub>18:3</sub> )	0,46	-
Арахидиновая	2,63	2,0

Как видно из данных таблицы по жирнокислотному составу масло из семян расторопши пятнистой, выращенной в Центральном ботаническом саду НАН Б близко к маслу плодов расторопши, выращенной на Куйбышевской ЗОС ВИЛАР [1]. Следует также отметить, что по жирнокислотному составу наиболее близко к маслу расторопши масло подсолнечное (содержание олеиновой кислоты – 21,5%, линолевой – 69,4%, линоленовой – 0,5%) [1].

Экстракция фенольных соединений из плодов расторопши пятнистой осуществлялась по стандартной методике [4]. Полученная субстанция силимарина составила 3% от массы семян расторопши пятнистой, что согласуется с литературными данными [1]. Для подтверждения наличия основных соединений полифенольной природы проводили качественное исследование сухого экстракта методом ТСХ. (рис. 2) В качестве стандартов при идентификации соединений в исследуемом экстракте использовали коммерческие субстанции силимарина, силибина и таксифолина фирмы Sigma.

Как видно из рисунка 2А, полученный нами силимарин содержит большое количество силибина. Для получения индивидуальных флаволигнанов методом препаративной колоночной хроматографии нами была осуществлена предварительная обработка силимарина. Она состояла в частичной перекристаллизации силибина из силимарина, основанной на разности растворимостей этих двух субстанций в смеси этилового спирта и воды [6]. На представленной хроматограмме (рис. 2Б) видно, что силибин почти полностью выпадает в осадок (дорожка 3). Таким образом, несколько циклов предварительной рекристаллизации силибина из силимарина может привести к частичному освобождению силимарина от силибина, что будет способствовать более полному дальнейшему разделению.

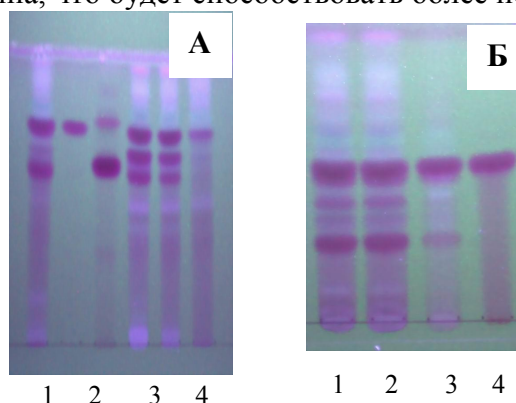


Рисунок 2 – Хроматограмма полученной субстанции силимарин (А) и хроматограмма силимарина после перекристаллизации (Б): А - дорожка 1 – силимарин (Sigma), дорожка 2 – силибин (Sigma), дорожка 3 – таксифолин (Fluka), дорожка 4 – силимарин. Б - 1 – раствор силимарина в абсолютном спирте, дорожка 2 – раствор силимарина после добавления 10% воды, дорожка 3 – выпавший осадок (силибин), дорожка 4 – силибин (Sigma)

Для получения индивидуальных флаволигнанов в значительных количествах из силимарина был разработан метод препаративной колоночной хроматографии на сорбенте Toyopearl HW-75. Полученный в результате этой хроматографии силимарина профиль элюции флаволигнанов приведен на рисунке 3. На данном профиле можно увидеть четыре четко выраженных пика, соответствующих объемам подвижной фазы 128,4 мл (пик I), 160,8 мл (пик II), 201,6 мл (пик III), 278,4 (пик IV).

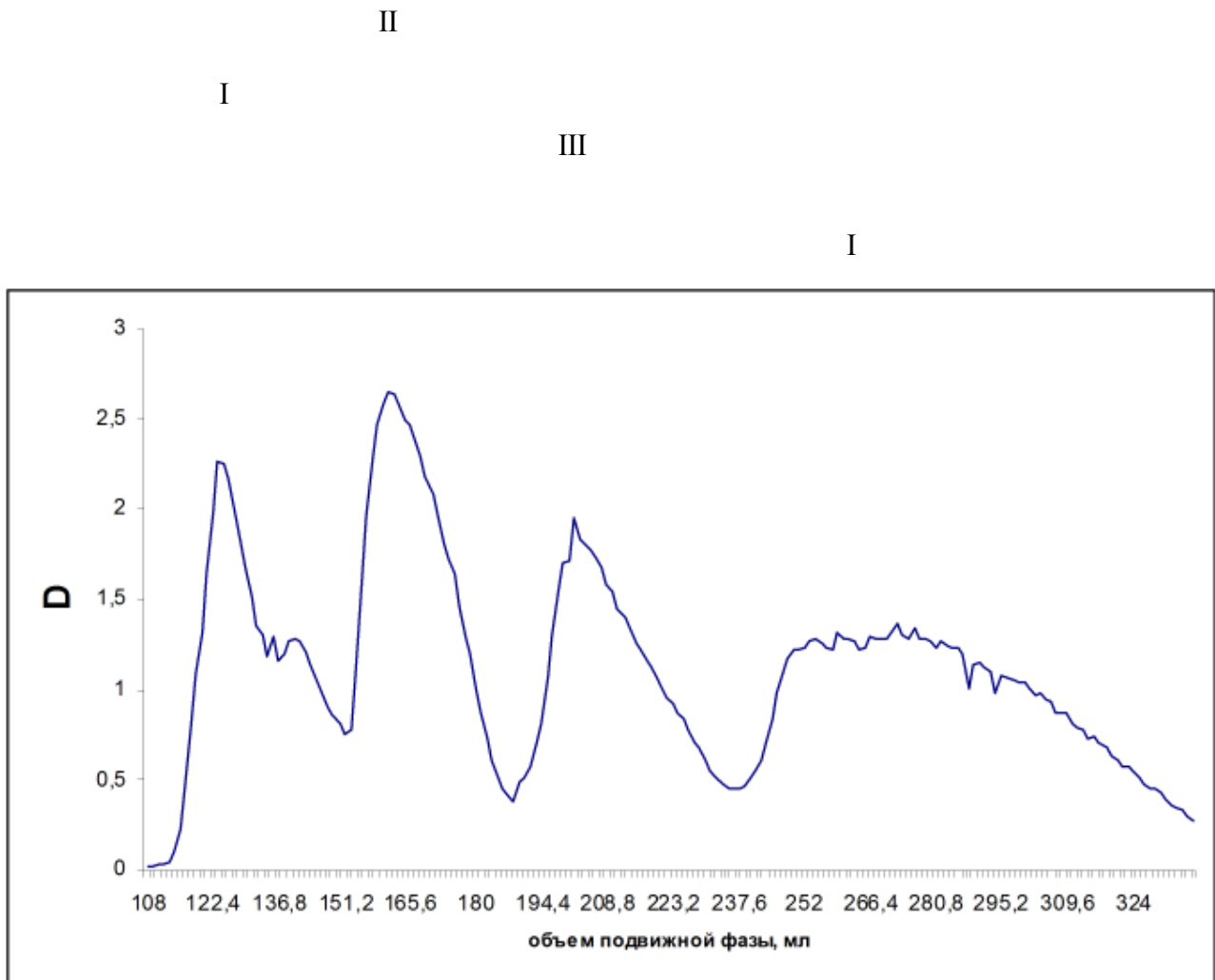


Рисунок 3 – Профиль элюции флаволигнанов из расторопши пятнистой, полученный в результате препаративной колоночной хроматографии (сорбент Toyopearl HW-75). На рисунке обозначены пики I (128,4 мл), пик II (160,8 мл), пик III (201,6 мл), пик IV (278,4 мл), длина волны – 290 нм

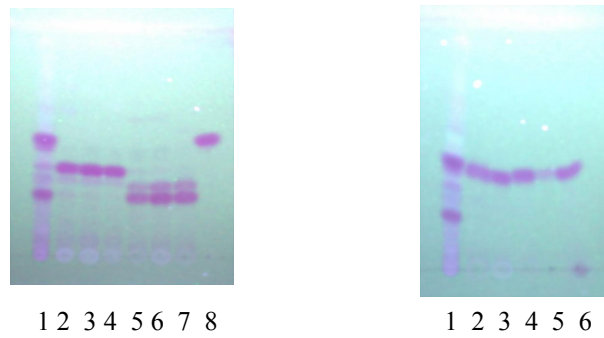
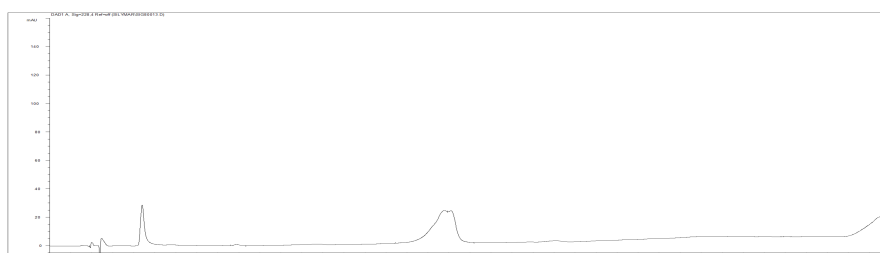
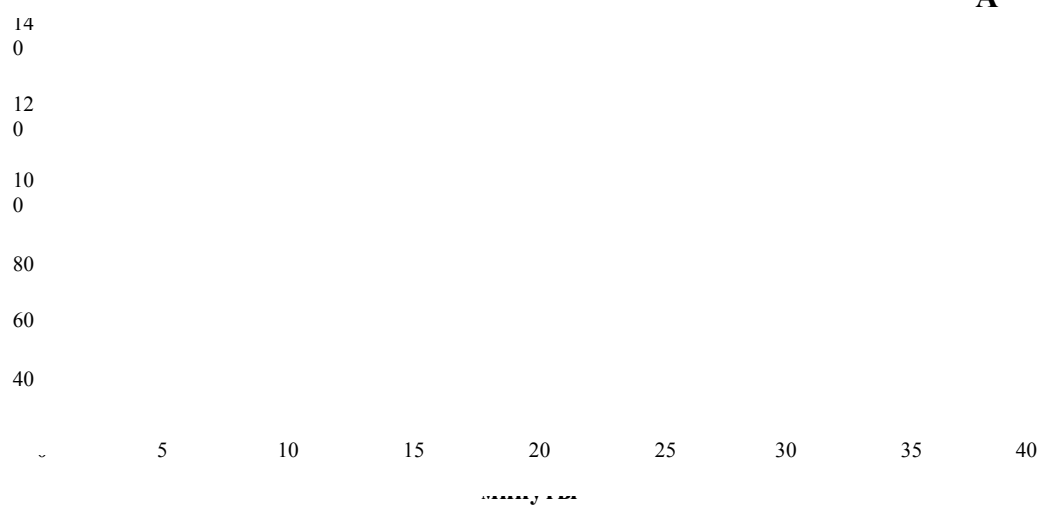


Рисунок 4 – Хроматограмма полученных субстанций: **А** - дорожка 1 – силимарин (Sigma), дорожка 2 – фракция II (156 мл), дорожка 3 – фракция II (160,8 мл), дорожка 4 – фракция II (171,6 мл), дорожка 5 – фракция III (196,8 мл), дорожка 6 – фракция III (201,6 мл), дорожка 7 – фракция III (213,6 мл), дорожка 8 – силибин (Sigma); **Б** - дорожка 1 – силимарин (Sigma), дорожка 2 – фракция IV (246 мл), дорожка 3 – фракция IV (254,4 мл), дорожка 4 – фракция IV (278,4 мл), дорожка 5 – фракция IV (306 мл), дорожка 6 – силибин (Sigma)

mAU

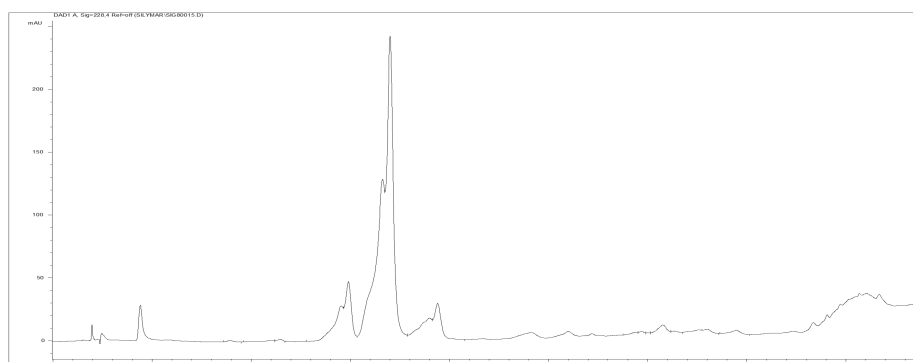
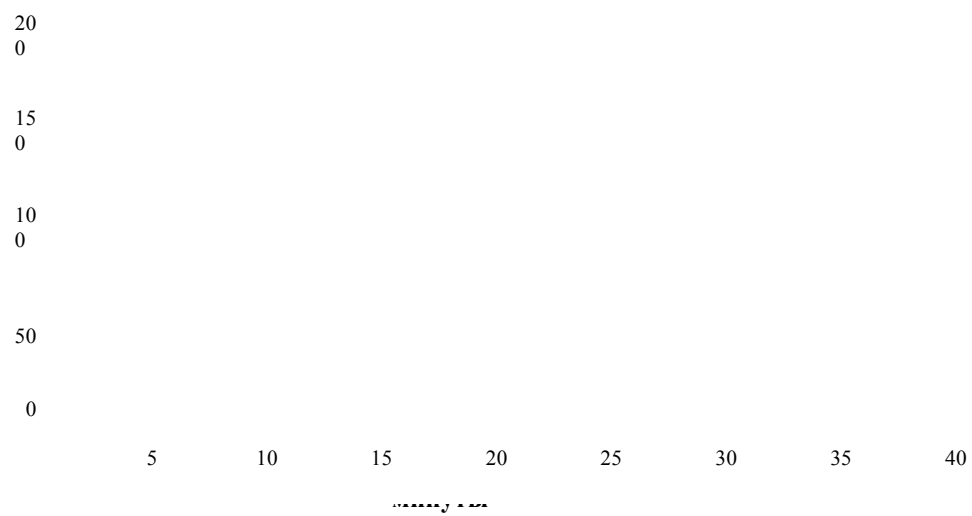
A





mAU

Б



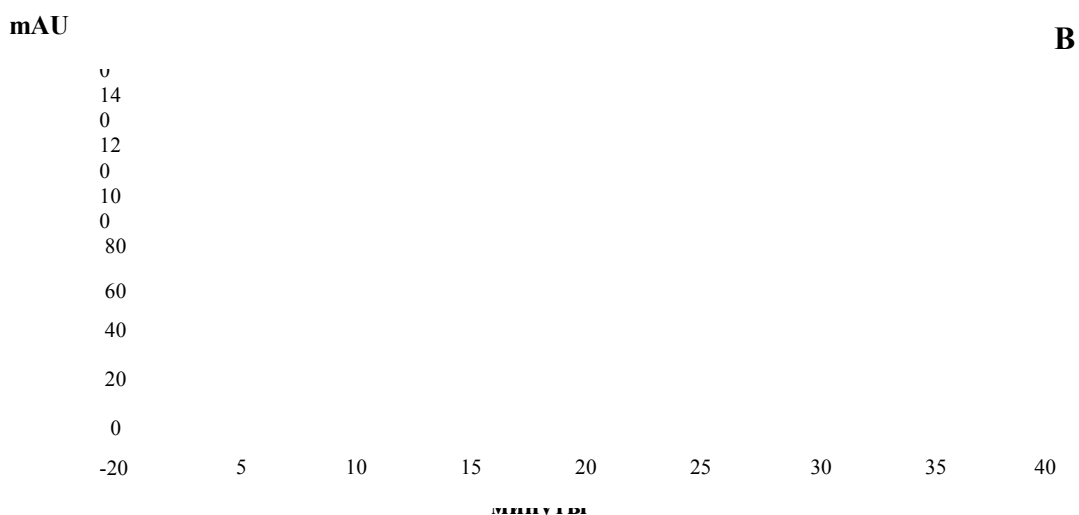


Рисунок 5 – Профили элюции фракций из пиков II, III и IV (рис. 4) А – фракция II (силидианин); Б – фракция III (силикрестин); В – фракция IV (силибин)

Для идентификации химических веществ, содержащихся в вышеуказанных фракциях, нами были проведены тонкослойная хроматография и обращенно-фазовая ВЭЖХ. Было показано, что субстанции получены с достаточно высокой чистотой (рис. 4, 5). Были рассчитаны величины  $\eta_f$  для всех полученных веществ, которые составили: 0,42 (пик III), 0,25 (пик II), 0,45 (пик IV). Полученные величины  $\eta_f$  позволили предварительно идентифицировать полученные вещества как силидианин, силикрестин и силибин соответственно. Недостатком предложенного метода разделения является то, что минорный компонент экстракта - флавоноид таксифолин не отделился от основной фракции, а выступил как загрязнитель во 2 и 3 фракции, что можно видеть на рис. 4А дорожки 2-7.

На рисунке 5 изображены профили элюции фракций из пиков II, III и IV.

Как видно из рисунка 5, использование колоночной хроматографии на сорбенте Toyopearl HW-75 позволяет получить изомеры флаволигнанов в достаточно чистом виде. Применение подхода с использованием внутреннего хроматографического стандарта (таксифолин фирмы “Sigma”) позволило установить чистоту каждого полученного из флаволигнанов. Для силибина она составила 98,277%, для силидианина – 99,036% и для силикристина – 68,27%.

### **Выводы**

Плоды расторопши пятнистой содержат биологически активные вещества, белки, жирные кислоты и другие соединения. Комплексная переработка плодов расторопши позволяет безотходно использовать сырье: шрот рекомендуется использовать в качестве пищевой добавки в животноводстве, масло и силимарин широко используется в медицине и фармацевтической промышленности. Масло расторопши пятнистой в своем составе содержит большое количество насыщенных и ненасыщенных жирных кислот, и по жирнокислотному составу оно близко к подсолнечному маслу.

В результате проведенных исследований удалось получить очищенные препараты отдельных флаволигнанов: силидианина, силикристина и силибина. Было показано, что предварительная перекристаллизация силибина из спиртового экстракта силимарина приводит к частичному удалению этого доминирующего флаволигнана из смеси флавоноидов, что позволяет более полно провести последующее разделение компонентов. Использование метода жидкостной хроматографии низкого давления на сорбенте Toyopearl HW-75 позволяет разделить силимарин на отдельные стереоизомеры с достаточно высокой чистотой.

### **Литература**

1. Сокольская, Т.А. Создание лекарственных средств из плодов расторопши пятнистой (получение, стандартизация и контроль качества): дис. на соискание уч. степ. доктора фарм. наук: 15.00.02 / Т.А. Сокольская; Моск. мед. академ. им. И.М. Сеченова. – Москва, 2000. – 79 л.
2. Pepping, J. Milk thistle: *Silybum marianum* / J. Pepping. // *American Journal of Health-System Pharmacy*. – 1999. – Vol. 56, № 12. – P. 1195-1197.
3. Реестр лекарственных средств России. Энциклопедия лекарств / гл. ред. Крылов Ю. Ф. – М.: “РЛС-2000”, 7 изд., 2000. – 1520 с.
4. Характеристика состава лекарственных препаратов и семян расторопши пятнистой (*Silybum marianum*) / А.С. Щекатихина [и др.] // *Труды БГУ. Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем*. – 2006. – Вып. I. – С.280–290.
5. Идентификация масел растительного происхождения / В.Н. Леонтьев [и др.] // *Молекулярно-биологические и физико-химические методы идентификации биологических объектов и материалов различного происхождения: материалы II республиканской научно-практической конференции, 20-22 ноября 2003 г.* / Белорус. гос. ун-т; редкол: И.В. Войтов [и др.]. – Минск, 2003. – С. 67–70.
6. *Silybin and silymarin - new and emerging applications in medicine* / R. Gazák [et al.] // *Curr. Med. Chem*. – 2007. – Vol. 14, № 3. – P. 315–318.

## **EXTRACTION OF BIOLOGICAL ACTIVE SUBSTANCES FROM MILK THISTLE (*SILYBUM MARIANUM* (L.)) SEEDS**

**A.S. Schekatsikhina, T.M. Vlasova, V.P. Kurchenko**  
*Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus*

Milk thistle seeds are the unique source of biological active substances: flavonoids, flavolignans, organic acids, fatty acids and proteins. Due to flavolignans Milk thistle fruits are often used as medicine to cure liver diseases. There is a lot of extraction methods described in papers to provide pharmaceutical industry with sufficient quantity of flavolignans. Many articles are devoted to separation and structure analysis of flavolignan isomers from Milk thistle seeds, but described methods in such papers are usually very expensive, hard to repeat and do not lead to full separation of isomers. This work performs analysis of different extraction and separation methods of flavolignans and other biological active substances from Milk thistle seeds.