



Kauno technologijos universitetas
Cheminės technologijos fakultetas



Lietuvos sveikatos mokslų universitetas
Farmacijos fakultetas

Silimarino sudėties įvairavimo vertinimas komerciniuose fitopreparatuose

Baigiamasis magistro projektas

Grėtė Kazlauskytė

Projekto autorė

Prof. dr. Valdas Jakštas

Vadovas

Kaunas, 2020



Kauno technologijos universitetas
Cheminės technologijos fakultetas

Lietuvos sveikatos mokslų universitetas
Farmacijos fakultetas

SILIMARINO SUDĖTIES ĮVAIRAVIMO VERTINIMAS KOMERCINIUOSE FITOPREPARATUOSE

Baigiamasis magistro projektas
Medicininė chemija (6281CX001)

Grėtė Kazlauskytė
Projekto autorė

Prof. dr. Valdas Jakštas
Vadovas

Lekt. Mindaugas Liaudanskas
Recenzentas

Kaunas, 2020



Kauno technologijos universitetas
Cheminės technologijos fakultetas

Lietuvos sveikatos mokslų fakultetas
Farmacijos fakultetas

Grėtė Kazlauskytė

Silimarino sudėties įvairavimo vertinimas komerciniuose fitopreparatuose

Akademinio sąžiningumo deklaracija

Patvirtinu, kad mano, Grėtės Kazlauskytės, baigiamasis projektas tema „Silimarino sudėties įvairavimo vertinimas komerciniuose fitopreparatuose“ yra parašytas visiškai savarankiškai ir visi pateikti duomenys ar tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti sąžiningai. Šiame darbe nėra viena dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar internetinių šaltinių, visos kitų šaltinių tiesioginės ir netiesioginės citatos nurodytos literatūros nuorodose. Įstatymų nenumatytų piniginių sumų už šį darbą niekam nesu mokėjusi.

Aš suprantu, kad išaiškėjus nesąžiningumo faktui, man bus taikomos nuobaudos, remiantis Kauno technologijos universitete galiojančia tvarka.

Grėtė Kazlauskytė

(parašas)

Kazlauskytė, Grėtė. Silimarino sudėties įvairavimo vertinimas komerciniuose fitopreparatuose. Baigiamasis magistro projektas / vadovas prof. dr. Valdas Jakštas; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas; Lietuvos sveikatos mokslų fakultetas, Farmacijos fakultetas. Studijų kryptis ir sritis (studijų krypčių grupė): chemija, fiziniai mokslai.

Reikšminiai žodžiai: silimarinas, flavonoidai, fitopreparatai.

Kaunas, 2020. 62 p.

Santrauka

Tyrimo tikslas – išanalizuoti ir palyginti vaistinių asortimento komercinių preparatų su margalapių margainių ruošiniais silimarino sudėties ypatumus.

Tyrimo uždaviniai:

1. nustatyti ir palyginti silimarino komercinių fitopreparatų kiekybinę sudėtį, taikant ultra efektyviosios skysčių chromatografijos analizės metodą;
2. ultra efektyviosios skysčių chromatografijos – tandeminės masių spektrometrijos metodu išanalizuoti ir palyginti silimarino preparatų fenolinių junginių kompoziciją.

Tyrimo objektas. Tyrimui buvo atrinkta 10 fitopreparatų su silimarino (lot. *Silybum marianum L.*) vaistine augaline žaliava. Visi preparatai tiekiami Lietuvos rinkai, jiems suteikta vaisto rinkodaros teisė arba jie notifikuoti Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos. Pasirinkti preparatai, kurių pagrindinė sudedamoji dalis valyti ir kiekybiškai įvertinti sausieji *Silybum marianum L.* vaisių ekstraktai ar kitokie ruošiniai. Tyrimui pasirinkta 5 vienkomponenčiai preparatai ir 5 daugiakomponenčiai preparatai. Iš jų 5 nereceptiniai vaistiniai preparatai ir 5 maisto papildai.

Tyrimo metodai. Ultra efektyvioji skysčių chromatografija pasirinkta kiekybiniam flavonolignanų nustatymui. Šiuo metodu buvo atliekamas tiriamųjų mėginių skirstymas ir silimarino komponentų koncentracijos nuokrypių stebėjimas. Kiekybiniam analizės metodo skirstymui taikomas judrios fazės gradientas. Judriosios fazės A eliuentas: dejonizuotas vanduo. Kitas judriosios fazės B eliuentas: fosforo rūgšis R, metanolis R, vanduo R (0,5:35:65 V/V/V). Kaip kiekybinis rodiklis buvo vertinamas analičių smailių plotas. Kiekvieno tirpalo tyrimas kartojamas 3 kartus. Buvo atliktas fitopreparatų kokybinis nustatymas ultra efektyviosios skysčių chromatografijos – tandeminės masių spektrometrijos metodu. Tyrimo metu gautų flavonoidų chromatografinės smailės identifikuotos pagal analitės bei etaloninio junginio sulaikymo trukmę (R_t) ir masių spektrometriniu detektoriumi gautus etanolinių junginių ir analičių masių spektrus. Chromatografinės smailės identifikuotos taikant daugialypių reakcijų stebėsenos (MRM) bei skenavimo režimus.

Tyrimo rezultatai ir išvados. Ištyrus fitopreparatų su margalapių margainių ruošiniais tiriamuosius tirpalus ultra efektyviosios skysčių chromatografijos tandeminės – masių spektrometrijos metodu nustatyti dominuojantys biologiškai aktyvūs junginiai. Visų tirtų fitopreparatų mėginiuose nustatyti pagrindiniai silimarino junginiai – silikristinas, silidianinas, silibininas A, silibininas B, izosilibinas A, izosilibinas B. Tirtuose fitopreparatuose taip pat identifikuoti šie fenoliniai junginiai ir polifenolinės rūgštys: nereceptiniame vaistiniame preparate (1) – chino rūgštis, 3,4-dihidroksibenzoinė rūgštis, ferulo rūgštis, dikafeoilchino rūgštis, kemferol-3-O-gliukozidas, apigenino-7-gliukozidas, eriodiktiolis, kvercetino dariniai, kemferolis, pinocembrinas, chrizinas, nereceptiniame vaistiniame preparate (2) – chino rūgštis, dikafeoilchino rūgštis, kvercetin-7-

gliukozidas, taksifolinas, kemferol-3-O-gliukozidas, apigenino-7-gliukozidas, eriodiktiolis, kvercetino dariniai, kemferolis, pinocembrinas, chrizinas, maisto papilde (3) – chino rūgšties dariniai, sinapo rūgštis, taksifolinas, apigenino-7-gliukozidas, eriodiktiolis, kvercetas, pinocembrinas, chrizinas, maisto papilde (5) – chino rūgšties dariniai, 3,4-dihidroksibenzoinė rūgštis, chlorogeno rūgštis, kavos rūgšties dariniai, kemferol-3-O-glukuronidas, taksifolinas, kemferol-3-O-gliukozidas, florizinas, eriodiktiolis, miricetas, kvercetas, izoramnetinas, pinocembrinas. Pritaikius ultra efektyviosios skysčių chromatografijos metodą buvo iširta 10 komercinių fitopreparatų, kurių sudėtyje nurodytas silimarinas. Palyginus silimarino kiekybinius rodiklius, nustatyta, kad lignanoflavonų profilis įvairuoja. Nustatyta, kad silibinino A ir B sumos dalis svyravo nuo 54,69 proc. iki 67,06 proc. bendro visų flavonolignanų kiekio. Didžiausia silibinino A ir silibinino B sumos procentinė dalis buvo nustatyta nereceptinio vaistinio preparato (3) tiriamajame mėginyje. Atsižvelgus į fitopreparatų gamintojo nurodytą silimarino kiekį dozuotės vienetė, buvo įvertinta gautų kiekybinių rodiklių atitiktis ženklinimui ir nustatyta, kad fitocheminės sudėties variacija yra būdinga silimarino produktams.

Grėtė Kazlauskytė. Evaluation of silymarin composition variation in commercial phytopreparations. Final master's project. Supervisor Professor. Dr. Valdas Jakštis. Kaunas University of Technology, Faculty of Chemical Technology; Lithuanian University of Health Sciences, The Faculty of Pharmacy; Keywords: silymarin, flavonoid, phytopreparation.

Kaunas, 2020. 62 pages.

Summary

Research aim – to analyze and compare the peculiarities of the composition of silymarin in a range of commercial preparation with a variety of milk thistle preparations.

Research goals:

1. to determine and compare the quantitative composition of silymarin commercial phytopreparations by high performance liquid chromatographic analysis;
2. to analyze and compare the composition of phenolic compounds of silymarin preparations by ultra high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry.

Research objective. 10 herbal products containing silymarin were investigated. The study was performed by analyzing the composition of herbal food supplements and medicinal preparations in the assortment of the Lithuanian pharmacies supply. Selected preparations contain extracts of *Silybum Marianum* L. 5 – one component preparations were selected for the study, and 5 multicomponent preparations. Of these, 5 over-the-counter medications and 5 dietary supplements were selected.

Research method. Ultra high performance liquid chromatography selected for the quantification of flavonolignans. The distribution of test samples and monitoring of deviations in the concentration of silymarin components were performed by the ultra high performance liquid chromatography method. The mobile phase gradient was used for the separation of analytes. Mobile phase A eluent was: deionized water. Another mobile phase B eluent was the mixture of: phosphoric acid R, methanol R, and water R (0.5:35:65 V/V/V). The area of the analytical peaks was used for quantitative processing. Repeatability of the test for each solution was 3 times. Qualitative testing of phytopreparations by ultra-efficient liquid chromatography-tandem mass spectrometry also was performed. The chromatographic peaks of the flavonoids obtained during the study were identified by the retention time (Rt) of the analyte and the reference compound and the mass spectra of analytes obtained with a mass spectrometric detector. Chromatographic peaks were identified using multiple reaction monitoring (MRM) and scanning modes.

Research results and conclusion. After examination of the constituents of the herbal preparations, the test solutions, in particular the efficient tandem mass spectrometric methods for liquid chromatography, relating to all the most appropriate methods. The following compounds were also identified: over-the-counter drug (1) – quinic acid, 3,4-dihydroxybenzoic acid, ferulic acid, dicapheoylquinic acid, kemferol-3-O-glucoside, apigenin-7-glucoside, eriodictol, quercetin derivatives, kemferol, pinocembrin, chrysin, over-the-counter drug (2) – quinic acid, dicapheoylquinic acid, quercetin-7-glucoside, taxifoline, apigenin-7-glucoside, eriodictol, quercetin derivatives, kemferol, pinocembrin, chrysin, dietary supplements (3) – quinic acid derivatives, sinapic acid, taxifoline, apigenin-7-glucoside, eriodictol, quercetin, pinocembrin, chrysin, dietary supplements (5) – quinic acid derivatives, 3,4-dihydroxybenzoic acid, chlorogenic acid, coffee acid

derivatives, kemferol-3-O-glucuronide, taxifoline, kemferol-3-O-glucoside, florizine, eriodictol, myricetin, quercetin, isoramnetin, pinocembrin. The ultra high performance liquid chromatography method was applied for 10 commercial herbal products containing silymarin. Comparison of the quantitative parameters of silymarin revealed that the lignanoflavone profile varied. The sum of silibinin A and B was found to range from 54,69 proc. to 67,06 proc. of total amount of all flavonolignans. The highest percentage of the sum of silibinin A and silibinin B was found in the test sample (3) of the over-the-counter herbal medicine. Based on the amount of silymarin per dosage unit specified by the phytopreparator manufacturer, the compliance of the obtained quantitative indicators with the labeling was assessed and it was found that the variation in phytochemical composition is characteristic of silymarin products.

TURINYS

Lentelių sąrašas.....	10
Paveikslų sąrašas	11
Santrumpų ir terminų sąrašas	12
Įvadas.....	14
1. LITERATŪROS APŽVALGA	16
1.1. Tikrojo margainio botaninis apibūdinimas.....	16
1.2. Tikrųjų margainių vaisių vaistinės augalinės žaliavos cheminės sudėties ypatumai	16
1.2.1. Pagrindinio tikrųjų margainių vaisių vaistinės augalinės žaliavos cheminio komponento silibinino struktūra ir cheminės savybės.....	17
1.2.2. Silibinino glikokonjugatai: antioksidacinių savybių sintezė ir įvertinimas.....	17
1.3. Tikrųjų margainių vaisių veikliųjų medžiagų farmakologinis poveikis ir klinikinis veiksmingumas	19
1.3.1. Veikimo mechanizmas	19
1.3.2. Antioksidacinis poveikis	20
1.3.3. Antidiabetinis aktyvumas	20
1.3.4. Uždegimo slopinamasis poveikis	21
1.3.5. Hepatoprotekcinis poveikis	21
1.3.6. Imunomoduliacinis poveikis	22
1.4. Tikrųjų margainių vaisių vaistinės augalinės žaliavos biologiškai aktyviųjų junginių farmakokinetika	22
1.4.1. Absorbcija.....	22
1.4.2. Pasiskirstymas	23
1.4.3. Metabolizmas	23
1.4.4. Eliminacija.....	23
1.5. Tikrųjų margainių vaisių preparatų pritaikymas gydant įvairius sveikatos negalavimus	24
1.5.1. Preparatų pritaikymo galimybės įvairių ligų gydymui ir profilaktikai.....	24
1.6. Silimarino poveikis žmogaus audiniuose esantiems CYP-450 ir vaistų sąveikai	25
1.7. Nepageidaujamas poveikis	26
1.8. Tikrųjų margainių vaisių biologiškai aktyviųjų junginių identifikavimas	26
1.9. Apibendrinimas	28
2. MEDŽIAGOS IR TYRIMŲ METODAI	29
2.1. Tyrimo objektas.....	29
2.2. Eksperimentiniam tyrimui naudoti reagentai	31
2.3. Maisto papildų ir nereceptinių vaistinių preparatų mėginių paruošimas tiriamajam tirpalui...	32
2.4. Tyrimo metodai	32
2.4.1. Silimarino identifikavimas	32
2.4.2. Silimarino komercinių fitopreparatų kiekybinis identifikavimas efektyviosios skysčių chromatografijos (ESCh) metodu.....	32
2.4.3. Silimarino komercinių fitopreparatų kiekybinis identifikavimas ultra efektyviosios skysčių chromatografijos (UESCh) metodu	33
2.4.4. Silimarino komercinių fitopreparatų kokybinis identifikavimas ultra efektyviosios skysčių chromatografijos – tandeminės masių spektrometrijos (UESCh – MS) metodu.....	36
2.5 Duomenų analizės metodai.....	37
3. TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	38

3.1. Kokybinis komercinių silimarino fitoprepatų nustatymas ultra efektyviosios skysčių chromatografijos – tandeminės masių spektrometrijos (UESCh – MS) metodu.....	38
3.1.1. Flavonolignanų kokybinis nustatymas ultra efektyviosios skysčių chromatografijos tandeminės – masių spektrometrijos (UESCh – MS) metodu.....	38
3.1.2. Kitų fenolinių junginių ir jų rūgščių kokybinis nustatymas ultra efektyviosios skysčių chromatografijos tandeminės – masių spektrometrijos (UESCh – MS) metodu	43
3.2. Kiekybinis silimarino nustatymas efektyviosios skysčių chromatografijos (ESCh) metodu...	48
3.3. Kiekybinis silimarino nustatymas ultra efektyviosios skysčių chromatografijos (UESCh) metodu	48
Išvados.....	53
Literatūros sąrašas	54

Lentelių sąrašas

1 lentelė. Antioksidacinis silimarino poveikis [53]	24
2 lentelė. Preparatų pritaikymo galimybės	25
3 lentelė. Komercinių fitopreparatų žymėjimas (atsitiktinė tvarka), kurie naudojami tyrimams atlikti	29
4 lentelė. Gradientinio eliuavimo schema	33
5 lentelė. Gradientinis judrios fazės kompozicijos kitimas	34
6 lentelė. Gradientinis judrios fazės kompozicijos kitimas	35
7 lentelė. Fitopreparatų sulaikymo trukmių (Rt) vidurkiai	43
8 lentelė. NV1 vaistiniame preparate m/z jonui [M-H] ⁻ specifinėse chromatogramose identifikuotos smailės lyginant su etalonu	45
9 lentelė. NV2 vaistiniame preparate m/z jonui [M-H] ⁻ specifinėse chromatogramose identifikuotos smailės lyginant su etalonu	45
9 lentelės tęsinys. NV2 vaistiniame preparate m/z jonui [M-H] ⁻ specifinėse chromatogramose identifikuotos smailės lyginant su etalonu	46
10 lentelė. MP3 maisto papilde m/z jonui [M-H] ⁻ specifinėse chromatogramose identifikuotos smailės lyginant su etalonu	46
10 lentelės tęsinys. MP3 maisto papilde m/z jonui [M-H] ⁻ specifinėse chromatogramose identifikuotos smailės lyginant su etalonu	47
11 lentelė. MP5 maisto papilde m/z jonui [M-H] ⁻ specifinėse chromatogramose identifikuotos smailės lyginant su etalonu	47
12 lentelė. Silimarino sudėties kokybiniai rodikliai, apskaičiuoti remiantis Europos farmakopėjos metodika. I – NV1; II – NV2; III – NV3; IV – NV4; V – NV5; VI – MP1; VII – MP2; VIII – MP3; IX – MP4; X – MP5.	49
13 lentelė. Tirtų komercinių fitopreparatų nustatytas silimarino kiekis Europos farmakopėjos reglamentuojama metodika	50

Paveikslų sąrašas

1 pav. Silimarino komponentai silibinas A (1a) silibininas B (1b), izosilibinas A (1c), izosilibinas B (1d), silikristinas A (1e), silidianinas (1f) ir taksifolinas (1g).....	16
2 pav. Silibininio cheminė struktūra.....	17
3 pav. Naujų silibininio gliko-konjugatų bendrosios struktūros.....	18
4 pav. Naujų 9"- fosfodiesterio gliko-konjuguatų silibininio analogų sintezė.....	18
5 pav. Silimarino biologiškai aktyvių junginių izomerai.....	28
6 pav. Pamatinio tirpalo chromatograma (pažymėtos smailės: „silicristin“ – silikristinas, „silidianin“ – silidianinas, „silibinin A“ – silibininas A, „silibinin B“ – silibininas B, „izosilibinin A“ – izosilibininas A, „silibinin B“ – izosilibininas B).....	34
7 pav. Vaistinio preparato NV1 tiriamojo tirpalo bendroji jonų chromatograma.....	39
8 pav. Vaistinio preparato NV2 tiriamojo tirpalo bendroji jonų chromatograma.....	40
9 pav. Maisto papildu MP4 tiriamojo tirpalo bendroji jonų chromatograma.....	41
10 pav. Maisto papildu MP3 tiriamojo tirpalo bendroji jonų chromatograma.....	42
11 pav. Maisto papildu MP5 tiriamojo tirpalo bendroji jonų chromatograma.....	43
12 pav. Fenolinių junginių pavyzdžiai.....	44
13 pav. Silimarino komponentų procentinė dalis bendrame komplekse, nustatyta pagal komponentų smailių plotų dydžius.....	49

Santrumpų ir terminų sąrašas

AUC – chromatogramos smailės plotas

BCRP (angl. breast cancer resistance protein) – krūties vėžio atsparumo baltymo inhibitorius

BMR – branduolių magnetinis rezonansas

cAMP – ciklinis adenosino monofosfatas

CD4 + (angl. cluster of differentiation 4) – glikoproteinas, randamas imuninių ląstelių, tokių kaip: T pagalbinės ląstelės, monocitai, makrofagai ir dendritinės ląstelės, paviršiuje

CYP-450 – citochromas P-450

C_{max} – didžiausia koncentracija serume, kurią vaistas pasiekia organizme, suleidus vaistą ir prieš skiriant antrą dozę

DNR – deoksiribonukleorūgštis

DPPH – 2,2-difenil-1-pikrihidrazilo radikalas

EDQM - Europos direktoratas vaistų kokybei

ERK1/2 (angl. extracellular signal-regulated kinases) – tarpląsteliniu signalu reguliuojamos kinazės

ESC/ MS – efektyviosios skysčių chromatografijos – masių spektrometrijos metodas

FBG (angl. fasting blood glucose) – gliukozės kiekis kraujyje nevalgius

FRAP (angl. ferric reducing antioxidant power) – geležies jonų redukcijos antioksidacinės galios tyrimas

GPx (angl. glutathione peroxidase) – glutationo peroksidazė

GSH – glutationas

HbA1c – glikuotas hemoglobinas; hemoglobino, esančio eritrocituose, dalis, susijungusi su gliukoze

HepG2 – žmogaus kepenų vėžio linijos ląstelės

HOMA-IR – indeksas, insulino/gliukozės santykis

HPLC (angl. high-performance liquid chromatography) – efektyvioji skysčių chromatografija

HRS (angl. herbal reference substance) – augalinė palyginamoji medžiaga

IFN- γ – interferonas gama

IL-2 – interleukinas 2

IR – infraraudojoji spektroskopija

mTOR (angl. mammalian target of rapamycin) – žinduolių rapamicino taikiny, kurią žmonėms koduoja MTOR genas

MTL cholesterolis (*angl.* LDL cholesterol) – „blogasis” cholesterolis, mažo tankio lipoproteinų cholesterolis)

NF- κ B (*angl.* nuclear factor- κ B) – genų raišką imuninėje sistemoje reguliuojantis faktorius, dalyvaujantis įgimtame ir įgytame imuniniame atsake

Nrf2 (*angl.* nuclear factor erythroid 2-related factor 2) – transkripcijos faktorius, dalyvaujantis antioksidacinio atsako kelyje

OATP1B1 – organinis anijonų transportuojantis polipeptidas 1B1

PBMC (*angl.* a peripheral blood mononuclear cell) – periferinės kraujyje susiformavusios mononuklearinės ląstelės

Ph. Eur. – Europos farmakopėja

PPAR- γ (*angl.* peroxisome proliferator-activated receptor *gamma*) – peroksisomų proliferatorių aktyvinami γ receptoriai

PSO – Pasaulinė sveikatos organizacija

p38 (*angl.* mitogen-activated protein kinases) – mitogenų suaktyvintos baltymų kinazės, reaguojančios į streso dirgiklius

R – Europos farmakopėjoje aprašytas reagentas

ROS (*angl.* reactive oxygen species) – reaktyvios deguonies formos

RNR – ribonukleino rūgštis

R_t – sulaikymo trukmė

SOD (*angl.* superoxide dismutase) – fermentas, superoksido dismutazė

TIC – bendroji jonų chromatograma

UESCh – ultra efektyvioji skysčių chromatografija

UESCh/MS – ultra efektyvioji skysčių chromatografija – masių spektrometrija

UESCh-MS/MS – ultra efektyvioji skysčių chromatografija – tandeminė masių spektrometrija

UV – ultravioletiniai spinduliai

Ivadas

Vaistinius augalus savo reikmėms žmonės naudoja nuo giles senovės. Augalai, kurie sukaupia daug gydomųjų savybių turinčių veikliųjų medžiagų, vadinami vaistingaisiais. Nors tradiciniai cheminiai preparatai neabejotinai šiandien užima svarbesnę vietą klinikinėje praktikoje, vaistingieji augalai ir iš jų gaminami vaistai taipogi svarbūs. Pastebima tendencija, kad kai kuriuos sveikatos sutrikimus, jeigu įmanoma, stengiamasi gydyti augaliniais vaistais. Manoma, kad augalinės kilmės vaistai yra pranašesni už sintetinius, jų veikimas lėtesnis ir silpnesnis, tačiau jie gali būti vartojami profilaktiškai, turi mažesnę šalutinį poveikį. Todėl dauguma vartotojų rūpindamiesi savo sveikata ir jos profilaktika stengiasi išvengti cheminių vaistų ir kaip alternatyvias priemones cheminiams vaistams renkami maisto papildus ar vaistinius fitopreparatus. Pasirinkimo galimybės labai plačios – nuo vaistažolių ir maisto papildų iki daugiakomponenčių farmacinių produktų. Tačiau komercinių produktų kokybė, o kartu ir nauda, nepakankamai mokliškai ištirta. Į vaistines patekti gali tik toks produktas, kurio efektyvumas yra patvirtintas. Augalinio vaistinio preparato ar maisto papildu efektyvumui užtikrinti reikia daug įvairių tyrimų ir ilgalaikio vartojimo duomenų analizės. Deja, alternatyvių cheminiams vaistams sveikatinimui skirtų komercinių produktų kokybės užtikrinimo sistema nėra tiesiogiai siejama su efektyvumu. Akivaizdu, kad toks dalies sveikatinimui skirtų produktų kokybės modelis ne visada dera su vartotojo produkto pasirinkimo ar išskyrimo produktų vertės grandinėje tikslais. Vieni iš svarbiausių sveikatinimui skirtų fitopreparatų tyrimų, be abejo, yra įvertinti ir kontroliuoti, kokias ir kiek medžiagų kaupia vaistinis augalas ir jo ruošiniai bei kurie iš tų junginių pasižymi naudingomis sveikatai savybėmis ir atitinka vartotojui tiesiogiai ar netiesiogiai perteikiamą informaciją apie produktą (įskaitant ženklimą ir reklamą). Neturint žinių apie įvairių grupių komercinių produktų reikšmingiausias savybes, neįmanoma tinkamai parinkti tinkamos alternatyvos galutiniam vartotojui.

Natūralių augalinių produktų turinio fitocheminio profilio kokybės kontrolė yra labai svarbi, nes augalinių preparatų farmakologinės ar fiziologinės savybės tiesiogiai priklauso nuo jų veikliųjų junginių kiekio. Išskiriama daugybė veiksnių, pavyzdžiui, klimatas, derliaus nuėmimo laikas, ekstrahavimas ir kiti veiksniai, kurie gali sukelti reikšmingą preparato veikliųjų medžiagų pokytį ir taip gali ne padėti, o pakenkti paciento sveikatai ir saugiam bei racionaliam augalinių vaistinių preparatų ir maisto papildų vartojimui [1,2].

Literatūros šaltinių duomenimis, plačiai vartojami flavonolignanų grupės junginiais turtingų margalapių margainių produktai. Nustatyta, kad margalapių margainių sveikatinamosios ir terapinės savybės yra nulemtos silimarino – flavonolignanų komplekso. Margalapių margainių žaliavoje, o kartu ir silimarine yra šie komponentai: silibininas A, silibininas B, izosilibininas A, izosilibininas B, silikristinas A, silikristinas B, silidianinas. Didžiausia koncentracija, apimanti maždaug 50–70 proc. silimarino, yra silibinino, kuris yra pagrindinis bioaktyvus ekstrakto komponentas [2,3].

Nors margalapių margainių ir silimarino produktai yra gana plačiai vartojami, tačiau jų sudėties įvairavimas mažai tirtas. Literatūros šaltiniuose skelbta tik pavienių mokslinių tyrimų rezultatų apie augalinių žaliavų, maisto papildų ar vaistinių preparatų, kurių sudėtyje yra silimarino ruošiniai, turinio variacijos ribas. Vienas iš pagrindinių kokybės kriterijų šaltinių yra Europos farmakopėja ir kitų regionų (kaip JAV) farmakopėjos, kuriose paskelbta daug monografijų apie augalinių medžiagų kokybės kontrolę.

Remiantis PSO, pagrindinis augalinių vaistų atpažinimo ir gryninimo žingsnis yra farmakologiniai tyrimai [4]. Norint įvertinti silimarino farmakologinio efekto atkuriamumą, reikia nuoseklia tvarka atlikti augalinės žaliavos analizę bei įvertinti veikliųjų medžiagų kokybinę ir kiekybinę sudėtį. Remiantis įvairiais moksliniais straipsniais, silimarino ir jo komponentų identifikavimas ir kiekybės bei kokybės kontrolė gali būti atliekama taikant chromatografinius metodus, masių spektrometriją, efektyviają skysčių chromatografiją. Šio tyrimo metu pasirinkta ultra efektyvioji skysčių chromatografija. Tai tikslus, greitas, jautrus ir informatyvus metodas [5,6]. Kadangi dalis silimarino preparatų gamintojų praturtina savo produktus kitais ingredientais ir ženklindami produktą apsiriboja tik silimarino procentiniu kiekiu, nenurodydami tikslios preparato sudėties, todėl šio tyrimo metu panaudotas dar vienas papildomas analizės metodas, ultra efektyvioji skysčių chromatografija – tandeminė masių spektrometrija, leidžiantis identifikuoti atskirus komponentus esančius fitopreparatuose, o kartu ir patikimai kokybiškai patvirtinti silimarino tapatybę produktuose [2].

Darbo tikslas – išanalizuoti ir palyginti vaistinių asortimento komercinių preparatų su margalapių margainių ruošiniais silimarino sudėties ypatumus.

Darbo uždaviniai:

1. ultra efektyviosios skysčių chromatografijos – tandeminės masių spektrometrijos metodu išanalizuoti ir palyginti silimarino preparatų fenolinių junginių kompoziciją;
2. nustatyti ir palyginti silimarino komercinių fitopreparatų kiekybinės sudėties rodiklius, taikant ultra efektyviosios skysčių chromatografijos analizės metodą. Palyginti kiekybės rodiklius su gamintojų pateikta informacija produktų ženkliniame.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

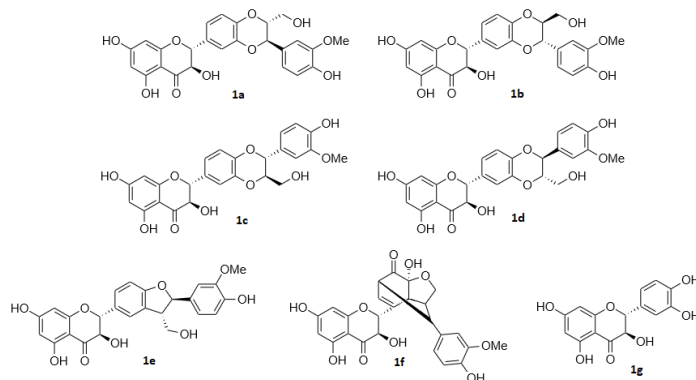
1.1. Tikrojo margainio botaninis apibūdinimas

Tikrasis margainis (lot. *Silybum marianum* L.) – astrinių (lot. *Asteraceae*) šeimos vaistinis augalas. Tai 60–150 cm aukščio vienmetis arba dvimetis žolinis augalas. Stiebas status, yra 40–200 cm aukščio, tvirtas, vagotas, šakotas, plikas, viršutinė jo dalis voratinkliškai plaukuota. Kiekvienas stiebas baigiasi raudonai violetiniu 5–6 cm diametro žiedynu. Žiedyno kraštai padengti spygliais. Augalo lapai plačiai lancetiški ar kiaušiniški, pliki, odiški, palei gyslas išmarginti pailgomis baltomis dėmėmis, jų kraštas dygliuotas arba dygliuotai dantytas; apatiniai lapai stambūs, plunksniškai iškarpyti ar suskaldyti, trumpakočiai, viršūniniai ištisiniai, apimantys stiebą. Lapai gali užaugti iki 50–60 cm ilgio ir 20–30 cm pločio, tačiau stieblapai yra gerokai mažesni. Vaisius – lukštavasis iki 7 mm ilgio, lygus, iš šonų suplotas, blizgantis, tamsiai rudas ar juosvas su šviesiomis išilginėmis dėmelėmis, 2,5–3,2 mm pločio, 1,8–2,8 mm storio. Vaisiai turi baltus skristukus, todėl, sėkloms subrendus, juos sparčiai išplatina vėjas. Žydi liepos – rugpjūčio mėnesį, rudenį subrandina sėklas. Medicinoje gydymui naudojami tikrųjų margainių vaisiai [7].

Geografiškai augalas labiausiai paplitęs vidutinių platumų klimato juostoje, pietvakarių Europoje ir Viduržemio pajūrio šalyse. Daug kur auginamas, sulaukėjęs aptinkamas beveik visoje Europoje (išskyrus šiaurinius kraštus), Vakarų Sibire, Vidurinėje Azijoje, Šiaurės Amerikoje. Lenkija yra didžiausias margainio sėklų ir preparatų tiekėjas visoje Europoje, kurios kultivuojama teritorija apima net 2000 hektarų žemės ploto. Lietuvoje auginamas darželiuose bei sodybų gėlynuose [9].

1.2. Tikrųjų margainių vaisių vaistinės augalinės žaliavos cheminės sudėties ypatumai

Tikrasis margainis pasižymi veikliųjų medžiagų gausa. Vaisiuose randama 15–30 proc. lipidų, esančių trigliceridų pavidalu. Daugiausia iš jų linoleinės rūgšties (~60 proc.), oleino rūgšties (~30 proc.), palmitino rūgšties (~9 proc.). Randama apie 30 proc. baltymų, cukrų (arabinozės, ramnozės, ksilozės, gliukozės), tokoferolio (vit. E) (0,038 proc.), sterolių (0,063 proc.), kaip antai: cholesterolis, stigmasterolis, sitosterolis bei nedidelis kiekis gleivių [10]. Fitochemiškai svarbiausių veikliųjų medžiagų – flavolignanų (kitais vadinamų silimarinu), randama 2–3 proc. Pagal Europos farmakopėjos reikalavimus, subrendusiuose margalapių margainių vaisiuose silimarino turi būti daugiau nei 1,5 proc. Farmakologinį poveikį ir apsprendžia minėtas flavonolignanų izomerų mišinys. Yra išskiriami pagrindiniai veikliosios medžiagos komponentai flavonolignanai (žr. 1 pav.) – silibininas A, silibininas B, izosilibinas A, izosilibinas B, silikristinas A, silikristinas B, silidianinas ir flavonoidas – taksifolinas [2,3].



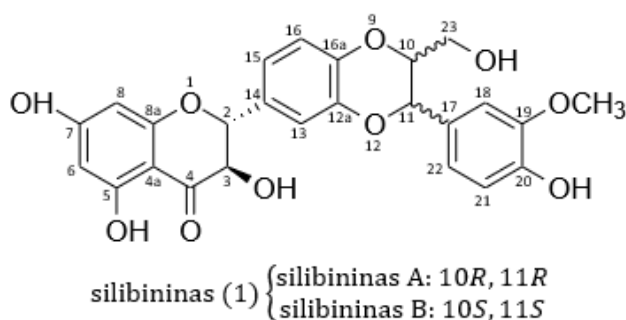
1 pav. Silimarino komponentai silibininas A (1a) silibininas B (1b), izosilibinas A (1c), izosilibinas B (1d), silikristinas A (1e), silidianinas (1f) ir taksifolinas (1g)

Didžiausia koncentracija, maždaug 50–70 proc. ekstrakto, yra silibinino, kuris yra pagrindinis bioaktyvus ekstrakto komponentas ir kurio randamos dvi izomerinės formos – silibininas A ir silibininas B [10]. Tikrojo margainio vaisių cheminėje sudėtyje be flavonolignanų, taip pat yra kitų flavonoidų (dihidrokvercetinas, kvercetinas, kemferolis, apigeninas, dihidrokemferolis, luteolin-7-O-gliukozidas, ir kt.) [2]. Tikrųjų margainių sausąjį ekstraktą sudaro rafinuotas ir standartizuotas sausas ekstraktas, gaunamas iš tikrojo margainio vaisiaus. Jame yra 90–110 procentų nominalios vertės silimarino kiekio, išreikšto silibininu [11].

1.2.1. Pagrindinio tikrųjų margainių vaisių vaistinės augalinės žaliavos cheminio komponento silibinino struktūra ir cheminės savybės

Cheminę silibinino struktūrą pirmiausiai nustatė Pelteris ir Hanselis 1968 m., panaudodami branduolių magnetinio rezonanso ir masių spektrometrijos metodus [14]. Silibinino komponentų molekulinė formulė – $C_{25}H_{22}O_{10}$ bei molekulinė masė – 482,44 [12].

Silibinino sudėtyje esančio flavonolignano struktūrą galima apibūdinti kaip mažą, labai funkcionalią molekulę su kintamais karbo ir hetero ciklais. Šio junginio stabilumas esant šarminėms sąlygoms sumažėja. Silibininas yra atsparus redukcijai, tačiau jis lengvai oksiduojamas į 2,3-dehidrosilibininą. Silibinino struktūroje yra penkios hidroksilo grupės, kurios yra pagrindiniai derivacijos taikiniai. Trys iš šių hidroksilo grupių (5-OH, 7-OH ir 20-OH) turi fenolinį pobūdį. 5-OH grupė turi labai stiprų ryšį su gretima okso grupe, kuri yra konjugacijoje su aromatiniu žiedu ir veikia kaip laisva elektronų pora, jungianti vandenilio ryšį su 5-OH grupe. 7-OH ir 20-OH turi panašias savybes, nors C-7 OH grupė yra reaktyvesnė nei 20-OH dėl mažesnių sterinių faktorių ir vandenilio jungties [13].



2 pav. Silibinino cheminė struktūra

Gamtoje silibininas yra dviejų trans-dia stereozimerų: A ir B pavidalu. Jie diferencijuoti C-10 ir C-11 padėtyse 1,4-benzodioxano žiede. Tiek silibininas A, tiek B pasižymi 1H ir ^{13}C BMR spektrais, kurie yra labai panašūs, be būdingų signalų, todėl sunku išsamiai identifikuoti atskirus izomeras [14].

1.2.2. Silibinino glikokonjugatai: antioksidacinių savybių sintezė ir įvertinimas

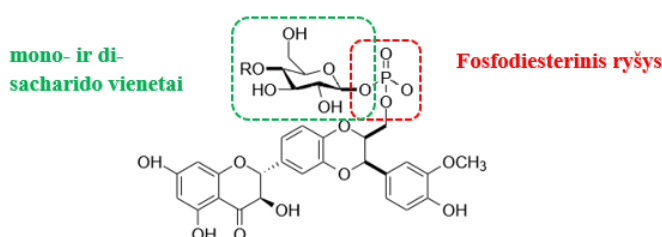
Struktūriškai natūralus silibininas yra diastereomerinis dviejų flavonolignanų, būtent silibinino A ir silibinino B mišinys santykiu 1:1. Silibininas yra metabolitas, turintis daugialypį biologinį aktyvumą, kuris paprastai siejamas su laisvųjų radikalų šalinimu. Jo terapinis efektyvumas gana ribotas dėl mažo biologinio prieinamumo. Silibinino produktai dažniausiai vartojami per *os*, o tai riboja natūralaus produkto veiksmingumą dėl prasto jo absorbcijos ir trumpo pusinės eliminacijos periodo organizme.

Norint pasiekti tikslinius audinius, ląsteles ir organeles, kad būtų pasiektas norimas terapinis poveikis, yra nustatyta keletas fizinių ir cheminių būdų, kuriais siekiama įvykdyti šiuos iššūkius. Buvo atliktos

kelios modifikacijos, kurios pakeičia chemines ir fizikines natūralių metabolitų savybes, padidėjo biologinis efektyvumas ir bendras įsisavinimas. Paprastai, kad veiklioji medžiaga patektų į audinius ir ląsteles, reikia naudoti nešiklį – vaisto kompleksus arba konjugatus, turinčius ligandą, kurį atpažįsta receptoriai tikslinėje ląstelėje.

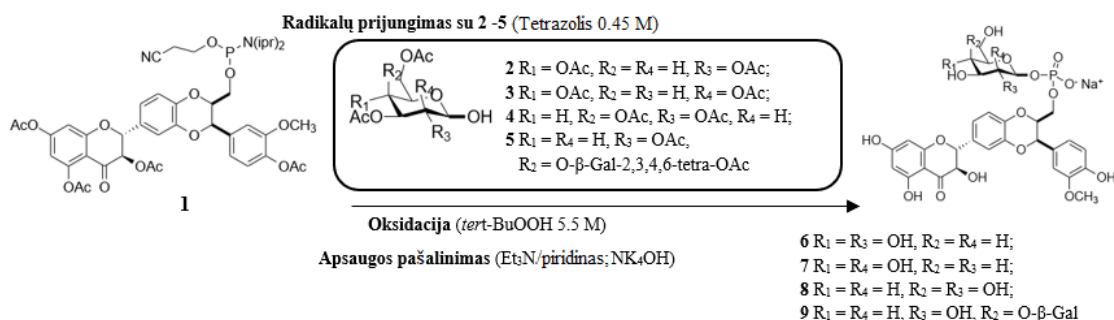
Hidroksilo grupių buvimas suteikia galimybę taikyti provaistus, leidžiančius pagerinti jo farmacinę farmakokinetines ir (arba) farmakodinamines savybes. Tai įrodo, kad sacharido fragmentų hidrofilinis pobūdis padidina aglikono tirpumą vandenyje ir padidina jo biologinį prieinamumą. Taip pat kitas iš būdų pagerinti farmacinę ir farmakokinetinę naudą yra fosfato grupės įvedimas [15].

3 paveiksle pateiktas efektyvios sintetinės procedūros rezultatas, gaunant naujus 9''-fosfodiesterio



3 pav. Naujų silibinino gliko-konjugatų bendrosios struktūros

silibinino konjugatus su skirtingais mono- ir di- sacharidų vienetais per hidroksilo grupę.



4 pav. Naujų 9''- fosfodiesterio gliko-konjugatų silibinino analogų sintezė

Kaip silibinino substratas naudojamas 9''-fosforamidai, o kaip pradinės cukraus medžiagos pasirinkti 1-OH visiškai apsaugoti mono- ir di- sacharidų dariniai (2–5), žr. 4 pav.). Iš pradžių mono- ir di- sacharidai, reaguodami su THF benzilaminu kambario temperatūroje, paverčiami 1-OH dariniais. Taigi 2–5 junginiai (žr. 4 pav.) sujungti su 1 dariniu, naudojant 0,45 M tetrazolą. Visi junginiai paversti į atitinkamas natrio druskas, kad būtų kristaliniai mėginiai. Po to medžiagos analizuojamos atvirkštinės fazės analizės būdu, naudojant įvairias kolonėles ir eliuavimo sąlygas. Galiausiai nauji silibinino analogai (6-9), žr. 4 pav.) gauti kaip diastereomerų mišinys, 31P NMR analizės metu, naudojant Sep-Pak C18 kolonėlę.

Nauji dariniai buvo ištirti atliekant DPPH laisvųjų radikalų surišimo metodą ir atliekant ksantino oksidazės slopinimo modelių tyrimą, siekiant įvertinti jų antioksidacinį aktyvumą. Galima daryti išvadą, kad nepriklausomai nuo tiriamo cukraus fragmento, visi junginiai pasižymi šiek tiek didesniu radikalų surišimo aktyvumu ir ksantino oksidazės slopinimu nei silibininas. Kita vertus, nauji dariniai parodė tirpumą vandenyje žymiai didesnę nei silibininas [15].

1.3. Tikrųjų margainių vaisių veikliųjų medžiagų farmakologinis poveikis ir klinikinis veiksmingumas

1.3.1. Veikimo mechanizmas

Naudojant tikrųjų margainių vaisių veikliąją medžiagą pastaraisiais dešimtmečiais yra atlikta daug tyrimų, toliau gilesnį pažinimą pateikė naujaisi, įrodantys, kad silimarinas pasižymi ląstelių gyvybingumą skatinančiu regeneraciniu veikimu ir padeda apsaugoti kepenų ląsteles nuo žalingų veiksnių. Pagrindinės terapinės indikacijos yra toksiškas kepenų pažeidimas, palaikomasis gydymas pacientams, sergantiems lėtinėmis uždegiminėmis kepenų ligomis, ir kepenų ciroze [16]. Laboratorinių tyrimų metu nustatyta, kad silibininas stabilizuoja ląstelių membranas, pakeičia išorinę kepenų ląstelių struktūrą, taip neleidamas toksinėms medžiagoms patekti į ląstelę, tokiu būdu nepageidaujamos medžiagos iš karto pašalinamos iš organizmo. Silibininas sužadina detoksikacijos kelius ir greitina ląstelių atsinaujinimą, stimuliuodamas DNR sintezės prekursorius bei skatinandamas ląstelių fermentų gamybą ir naujų ląstelių susidarymą [17].

Tyrimais *in vivo* ir *in vitro* nustatyta, kad tikrųjų margainių vaisių augalo veikliųjų medžiagų komponentai pasižymi biologiniu poveikiu, kuris naudingas sveikatai. Įvairiais tyrimais patvirtinta, kad margalapių margainių vaistinės augalinės žaliavos biologinis veiksmingumas paprastai pasireiškia dėl flavanoidų mišinio, vadinamo silimarinu (1,5–3 proc.), kurį daugiausia sudaro anksčiau vardinti jo izomerai: silibinino (arba silibino) A ir B (50–60 proc.), izosilibinino (arba izosilibino) A ir B (5 proc.) bei veikliųjų medžiagų – silikristino (20 proc.) ir silidianino (10 proc.). Tyrimais įrodyta, kad vartojami margalapių margainių ruošinių vaistiniai preparatai sąlygoja šių veikliųjų medžiagų veikimo mechanizmus:

- reguliuoja ląstelės ir mitochondrijų membranų pralaidumą, padaro ją atsparesnę ksenobiotikų bei kitų hepatotoksinių medžiagų poveikiui ir patekimui į hepatocitus;
- slopina 5-lipooksigenazės metabolizmą ir leukotrienų B₄ (LTB₄) susidarymą *Kupffer* tipo ląstelėse;
- pasižymi antioksidaciniu poveikiu, suriša laisvuosius radikalus bei tumoro nekrozuojantį faktorių (TNF)- α ;
- skatina baltymų sintezę ribosomose bei stimuliuoja kepenų regeneraciją, aktyvindamas RNR ir DNR polimerazę A;
- antikancerogeninį ir uždegimą slopinantį poveikį.

In vitro/in vivo eksperimentai:

- slopina hepatocitų virtimą į miofibroblastus – procesą, atsakingą už kolageno skaidulų kaupimąsi kepenų cirozės metu;
- padidina insulino išsiskyrimą *in vitro*, bet ne *in vivo*, tokiu būdu slopindamas gliukozės išsiskyrimą;
- slopina padidėjusį kasos ir kraujo glutationo (GSH) kiekį bei aloksano sukeltą hiperglikemiją.

Citoplazminis poveikis:

- antioksidantas, užkertantis kelią vaistų sukeltam kepenų pažeidimui;
- galimas priešnavikinis poveikis;
- odos apsauginės savybės nuo UV sukeltos žalos eksperimentiniuose modeliuose;

- ląstelių membranų stabilumo pagerinimas;
- baltymų biosintezės sustiprinimas;
- antifibrotinis aktyvumas;
- antivirusinis aktyvumas;
- kaulų nykimo prevencija;
- neuroprotekcinis ir antiaterogeninis poveikis [18].

1.3.2. Antioksidacinis poveikis

Silimarinas yra natūralus antioksidantas. Silimarino antioksidaciniai mechanizmai apima laisvųjų radikalų susidarymo prevenciją, slopinant reaktyviausias deguonies rūšis (ROS) gaminančius fermentus, tiesiogiai šalina laisvųjų radikalų poveikį, jonų chelatus (Fe ir Cu) žarnyne, atlieka apsauginių molekulių (pvz., šilumos šoko baltymų, hibridinio baltymo tioredoksino- α -abeta ir baltymų klasės sirtuinų) sintezės skatinimą užtikrinančią papildomą apsaugą oksidacinio streso metu, silimarinas taip pat palaiko optimalią ląstelės redokso būklę, aktyvuodamas daugybę antioksidacinių fermentų ir neenziminių antioksidantų, daugiausia per transkripcijos veiksmus, įskaitant Nrf2 ir NF- κ B. Yra įrodyta, kad silimarinas labai padidina superoksido dismutazės raišką pacientams, sergantiems nealkoholiniu steatohepatitu, ir sumažina oksidacinį stresą pacientams, sergantiems β -talasemija.

Pažymėtina, kad silimarinas neturi tiesioginio poveikio etanolio metabolizmui ir nemažina etanolio kiekio pašalinimo iš organizmo [20]. Vieno iš tyrimo metu, panaudojant spektrofotometrinius FRAP ir DPPH metodus, buvo lygintas žaliosios arbatos, kuri, kaip žinoma, yra stiprus, natūralus antioksidantas ir silimarino antioksidacinis poveikis. Tyrimai parodė, kad silimarinas gali padidinti ir SOD, ir GPx aktyvumą, o tai paaiškina jo apsauginį poveikį dėl laisvųjų radikalų susidarymo. Silimarino antihemolitinis poveikis rodo didesnę silimarino laisvųjų radikalų, būtent peroksilo radikalų šalinimo aktyvumą lyginant su žaliaja arbata. Remiantis tyrimo rezultatais ir kitais mokslininkų darbais, galima teigti, kad silimarinas pasižymi dideliu apsauginiu poveikiu ir laisvųjų radikalų šalinimo mechanizmu nuo oksidacinio streso pažeidimų [21].

Be pagrindinių komponentų tikrųjų margainių sėklose yra labai daug aliejaus (20–30 proc.). Prieš ekstrahuojant silimariną iš sėklų būtina pašalinti aliejų, jis yra pramoninis silimarino gamybos šaltinis. Jame yra didelė nesočiųjų riebalų rūgščių, ypač linolo ir oleino rūgščių, koncentracija, naudinga žmogaus sveikatai – užkertant kelią arteriosklerozei, diabetui ir vėžiui. Jis rekomenduotas kaip natūralių antioksidantų šaltinis, nes jame gausu tokoferolio [22].

1.3.3. Antidiabetinis aktyvumas

Pastaruju metu silimarinas tampa populiarus dėl savo hipoglikeminių ir hipolipideminių savybių. Cukriniu diabetu sergantys pacientai pasižymi nenormalia antioksidacine būkle, glikozilintų baltymų pertekliumi. Apžvelgus mokslinę literatūrą, nustatytas margainio tiesioginis ir netiesioginis laisvuosius radikalus mažinantis poveikis. Įvertinta, kad silimarinas neleidžia padidėti gliukozės koncentracijai plazmoje ir stabdo kasos lipidų peroksidaciją [23]. Mokslininkai teigia, kad silimarinas užkerta kelią diabetui, kurį aloksanas (kristalinė medžiaga, gaunama organizme oksiduojant šlapimo rūgštį) sukelia žiurkėms. Manoma, kad šis poveikis pasireiškia dėl padidėjusios gliukozės koncentracijos plazmoje ir kasos glutatione [24,26]. Šiame tyrime pagrindinė iškelta hipotezė, kad silimarinas stabdo kasos antioksidacinių fermentų sumažėjimą, sukeltą aloksano. Svarbu pažymėti,

kad silimarinas atstatė šį fermentinį aktyvumą, kai buvo skiriamas 9 savaites ir 20 dienų po apsinuodijimo aloksanu. Kartu su šiuo poveikiu, gliukozės koncentracija sumažėja iki normalaus dydžio. Atliktų tyrimų rezultatai ir ankstesni mokslininkų duomenys rodo, kad silimarinas yra svarbi prevencinė priemonė cukrinio diabeto metu sukeltiems įvairiems oksidaciniams pažeidimams ir reikšmingas atkuriant normalią gliukozės koncentraciją kraujo serume, tai įrodo, kad hipoglikeminiai junginiai, turintys antioksidacinių savybių, yra vertingi antidiabetiniam aktyvumui.

1.3.4. Uždegimo slopinamasis poveikis

Silimarinas interferuoja su NF- κ B kontroliuojama transdukcijos kaskada. NF- κ B yra indukuojamas kaip baltymų kompleksas, kuris veikia kaip DNR transkripcijos reguliatorius ir svarbus uždegiminių procesų, ląstelės išgyvenimo, diferenciacijos ir augimo procesų iniciavimui ir kontrolei [28].

Mokslininkų atliktas tyrimas siekiant įvertinti uždegimo slopinamąjį, antivirusinį, imunomoduliacinį standartizuoto silimarino vaisių ekstrakto poveikį. Buvo atliktas eksperimentas su žiurkėmis, eksperimento rezultatai parodė, kad 250 ir 500 mg/kg silimarinas reikšmingai sumažino letenų edemą ($p < 0,05$) abiem būdais ir buvo palyginamas su deksametazono tirpalu ir žymiai skyrėsi nuo to, kurį sukėlė acetilsalicilo rūgštis ir 125 mg/kg silimarinas ($p < 0,05$). Todėl apibendrinant galima teigti, kad silimarinas pasižymi prieš uždegiminiu poveikiu žiurkių lėtinio uždegimo modelyje, kuris buvo žymiai efektyvesnis padidinus dozę iki 500 mg/kg. Vis dėlto svarbu pabrėžti, kad silimarino antiproliferacinis poveikis aprašytas daugiausia naudojant vieną silimarino komponentą – silibininą – santykinai didelėmis dozėmis (100–300 μ mol/l arba maždaug 50–150 μ g/ml) [29, 30]. Silimarino antiproliferacinis, prieš uždegiminis, imunomoduliacinis ir antivirusinis poveikis gali priklausyti nuo silimarino ir kitų silimarino ekstrakto esančių molekulių dozės ir molekulinės formos [31]. Pateikti duomenys atitinka nuomonę, kad silimarinas turi antioksidacinį ir uždegimo slopinamąjį poveikį.

Be to, nustatyta, kad silimarinas slopina endotelio, plaučių auglių, prostatos vėžio ir žmogaus hepatomos HepG2 ir Hep3B ląstelių dauginimąsi. Todėl silimarinas gali būti naudingas kaip vaistas nuo daugumos vėžio auglių rūšių [19,27]. Kadangi NF- κ β yra aprašomas kaip nuo redukcijos priklausantis transkripcijos faktorius, tikėtina, kad silimarinas sukelia prieš uždegiminius veiksnius, per antioksidacinį poveikį slopindamas baltymų kompleksą – NF- κ β . Taigi pabrėžtina, kad silimarinas moduliuoja membranos funkcijas ir jų ląstelių membranas ir yra naudingas citoprotekcijos ir kancerogenezės slopinime [32].

1.3.5. Hepatoprotekcinis poveikis

Kepenų ligos yra pagrindinės sergamumo ir mirštamumo priežastys visame pasaulyje. Nacionalinio piktnaudžiavimo alkoholiu ir alkoholizmo instituto paskelbta rezultatų ataskaita parodė, kad kepenų cirozė buvo 12-oji pagrindinė mirties priežastis JAV, ir paplitimas Vakarų šalyse siekia 20–30 proc [33,34]. Vienas iš alkoholio sukeliama kepenų pažeidimo mechanizmų yra laisvųjų radikalų susidarymas dėl šio ksenobiotiko metabolizmo. Silimarinas pasižymi tiek hepatoprotekcinio poveikiu, tiek regeneraciniu poveikiu. Silimarinas yra antioksidantas, apsaugantis kepenis nuo laisvųjų radikalų žalos, kurią sukelia alkoholio metabolizmas. Silimarinas veikia stabilizuojant biologines membranas ir skatinant sintezę [38]. Silimarinas sudaro kompleksą, apsunkinantį toksinų patekimą į kepenų ląstelių vidų. Be to, silimarinas metaboliškai stimuliuoja kepenų ląsteles ir aktyvina RNR ribosomų sintezę, kad būtų skatinamas baltymų susidarymas.

Mokslininkų Sandoval ir kt. paskelbtame tyrime [20] autoriai pastebėjo silimarino apsauginį poveikį žiurkių kepenų ląstelėms, kai jie naudojo jį kaip palyginimo koeficientą kepenų svoriui/gyvūno svoriui (hepatomegalija) įvertinti. Hepatomegalija buvo sumažinta, palyginti su kitomis grupėmis, kurioms buvo skiriamos antioksidacinės medžiagos. Taip pat jis sumažino kolageno kaupimąsi žiurkių sukeltoje tulžies fibrozėje 30 proc. Atlikti tyrimai su žmonėmis parodė, kad silimarinas sumažino apie 30 proc. kolageno kaupimąsi žiurkių sukeltoje tulžies fibrozėje. Tyrimas su žmonėmis parodė, kad šiek tiek padidėjo ciroziniu alkoholizmu sergančių pacientų išgyvenamumas naudojant silimariną [20]. Silimarinas yra bene dažniausiai visame pasaulyje naudojamas natūralus junginys kepenų ligoms gydyti dėl savo pripažinto antioksidacinio, uždegimą slopinančio ir antifibrozinio aktyvumo [38].

1.3.6. Imunomoduliacinis poveikis

Naudojant CD4⁺ splenocitus iš C57/B16 pelių, kai silimarino (etanolio ekstraktas) koncentracija 50 μM, buvo nustatyta, kad silimarinas reikšmingai slopino ląstelių dauginimąsi ir IL-2 bei IFN-γ gamybą kartu su P65/NF-κB fosforiliniu. Šie rezultatai rodo, kad silimarino ekstraktas gali slopinti T ląstelių aktyvaciją ir proliferaciją, ypač veikiančią NF-κB aktyvacijos/translokacijos keliais [35]. Tas pats efektas buvo įrodytas, kai buvo 100 μM koncentracijos silimarinas (etanolio ekstraktas) iširtas žmogaus CD4⁺ ląstelėse, gautose iš sveikų periferinio kraujo mononuklearinių ląstelių (PBMC) asmenų. Silimarino ekstraktas slopino T ląstelių dauginimąsi ir uždegimą slopinančią citokinų sekreciją *in vitro*, taip pat ERK1/2 ir P38 kelio aktyvaciją [36]. Dar vienas tyrimas parodė, kad tas pats silimarino preparatas esant 100 μM koncentracijai sukėlė reikšmingą aktyvuotų T limfocitų ląstelių ciklo G1 sustojimą ir slopinimą, fosforo-S6 ribosominio baltymo ir mTOR aktyvumą. Nepaisant to, imunomoduliuojantis silimarino poveikis labai priklauso nuo dozės ir lemia imunostimuliaciją vartojant mažomis dozėmis, o imunosupresiją vartojant didesnėmis dozėmis [37].

1.4. Tikrųjų margainių vaisių vaistinės augalinės žaliavos biologiškai aktyvių junginių farmakokinetika

Silibininas daugelyje mokslinių šaltinių yra išskiriamas kaip pagrindinis biologiškai aktyvus tikrųjų margainių vaisių junginys. Taigi silimarino farmakokinetiniai parametrai ir bet kuri silimariną turinčio produkto veiklioji medžiaga visada yra standartizuojami kaip silibininas [39]. Suaugusiųjų paros dozė kieto arba skysto ekstrakto yra 154–324 mg silimarino, nustatyto pagal Europos farmakopėjos ESCh analizės metodą, arba 200–420 mg silimarino taikant UV regimosios šviesos spektrofotometrijos metodą [11].

1.4.1. Absorbicija

Įprastai tikrųjų margainių vaisių preparatai vartojami per *os*. Pažymėtina, kad silimarino absorbicija yra gana maža dėl riboto silibinino tirpumo vandenyje (<0,1 mg/ml). Šį blogą biologinį prieinamumą gali lemti didelis II konjugacijos fazės reaktyvumas bei prastas absorbicijos greitis. Dėl blogo tirpumo yra svarbu naudoti medžiagas, gerinančias lipofilinių junginių tirpumą vandenyje, bei ieškoti tinkamo nešiklio. Sisteminių silibinino biologinį prieinamumą gali padidinti kompleksas su fosfatidilcholinu arba β-ciklodekstrinu ir tinkamas vaistinės formos pagalbinės medžiagos pasirinkimas. Tačiau nustatyta, kad silimarino komponentas silibininas greitai absorbuojamas iš skrandžio, maksimali koncentracija kraujyje pasiekama per 2–4 val., o pusinės eliminacijos laikas apie 8 val., tačiau per *os* absorbuojamas tik apie 23–47 proc. Todėl tikslinga, kad geriau absorbuojamo silibinino procentinė dalis silimarino komplekse būtų aukšta [41].

Silibininas komplekse su fosfatidilcholinu buvo sukurtas siekiant padidinti jo absorbciją. Eksperimentų metu nustatyta, kad temperatūra ir pH daro įtaką silibinino tirpumui. Temperatūrą keliant iki 45 °C ir pH palaikant ~6, silimarino koncentraciją vandeniniame tirpale galima padidinti iki 10 kartų [42]. Kaip fenolio pobūdžio junginys, jis gerai ištirpsta didėjant pH, tačiau visų silimarino flavonolignanų šarminiai tirpalai yra linkę oksiduoti, sudarydami stipriai geltonus 2,3-dehidro darinius [43]. Diskutuojama apie alternatyvas, kurios gerina vaistinės medžiagos biologinį pasisavinimą, kaip antai vaistinės medžiagos dalelės sumažinimas iki nano dydžio, aukšto slėgio homogenizavimu [40]. Buvo atliktas tyrimas, kurio metu buvo paruoštos silimarinu užpildytos mezoporinės silicio dioksido nanodelės ir įvertintos tirpumą gerinančios silimarino, kaip hepatoprotektoriaus savybės. Tirpumo testai *in vitro* parodė, kad silimarinas tirpsta greičiau, kai nano dalelės pakrautos silimarinu, lyginant su įprasta vaisto forma [43,44].

1.4.2. Pasiskirstymas

Norint, kad vaistinė medžiaga sukeltų teigiamą poveikį, ji turi organizme pasiskirstyti greitai ir pasiekti maksimalų efektyvumą. Maksimali silibinino koncentracija (laisvo ir konjuguoto) po absorbcijos žarnyne (kepenyse, plaučiuose, kasoje, prostatoje, skrandyje ir odoje) pasiekiami praėjus valandai po vaistinės medžiagos suvartojimo. Laisvo ir konjuguoto silibinino pusinis eliminacijos laikas šiuose audiniuose sudaro 57–127 ir 45–94 minutes atitinkamai. Silibinas į kepenis pernešamas aktyvaus transporto būdu, dalyvaujant P-glikoproteinui [45]. Mokslininkai Zhao ir Agarwal atliko veikliosios medžiagos pasiskirstymo audiniuose eksperimentą su pelėmis ir padarė išvadas, kad silibininas (50mg/kg) tiek laisvos, tiek konjuguotosios formos (pvz., gliukuronido ir sulfato konjuguotos formos) išgėrus greitai absorbuojamas ir gerai pasiskirsto įvairiuose audiniuose [40].

1.4.3. Metabolizmas

Silibininas praeina I ir II fazės metabolizmą ir II fazės konjugacijos reakcijas žmonių organizme. Silibinino I ir II fazės biotransformacijos vyksta kepenyse [46]. Yra žinoma, kad susidaro mono-, di- ir sulfo-gliukuronidai, kurie po to pasiekia plazmą ir tulžį [47]. *In vitro* silibininas metabolizuojamas CYP450-2C8 į o-demetilinto ir dihidroksi-silibinino metabolitus, ištirta, kad tik pirminių junginių metabolitai patenka į kraujotakos sistemą, tačiau vyksta ir I ir II fazės metabolizmo reakcijos [46]. Iš pradžių cheminės modifikacijos vyksta plonojoje žarnoje, skaidant cukrinę dalį (jei ji yra), po to išsiskyrę aglikonai gliukuronizuojami, sulfatuojami ir (arba) metilinami. Šiems metabolitams patekus į kraujotakos sistemą, II fazės metabolizmas gali vykti kepenyse ir kituose organuose [48]. 75–90 proc. silibinino dozės yra metabolizuojama į gliukuronido ir sulfato junginius, pagrindinės gliukuronizacijos vietos yra fenolinės OH grupės C-7 ir C-20 padėtyse. Gliukuronizacijos procese labai svarbus silibinino stereoselektyvumas. Silibininas B gliukuronizuotas veiksmingiau nei diastereomeras silibininas A [25]. Apibendrinant galima teigti, kad silibininas iš virškinimo trakto pasisavinamas prastai, konjuguojamas kepenyse, hidrolizuojamas žarnyno floros ir reabsorbuojamas (enterohepatinės cirkuliacijos keliu) [45].

1.4.4. Eliminacija

Tiek laisvas, tiek konjuguotas silibininas *in vivo* greitai pasišalina. Tačiau silibinino išsiskyrimas pro inkstus yra mažas ir sudaro tik 1–2 proc. originalios peroralinės dozės per 24 valandas. Nepaisant to, kepenų ir tulžies išsiskyrimas yra didelis, nes atlikus tyrimą silibinino koncentracija tulžyje buvo maždaug 100 kartų didesnė nei pacientų kraujo serume [49]. Pusinis silimarino eliminacijos periodas yra 6,32 val. ir daugiausia šalinamas su tulžimi, tačiau tik 1–7 proc. silimarino išsiskiria su šlapimu

nustatyto po silimarino pavartojimo praėjus 24 val. surinktame šlapime. Silibinino ekskrecijos su šlapimu ir tulžimi tyrimo metu su žiurkėmis, suleidus į veną arba sugirdžius silibinino N-metilgliukamino, parodė, kad silibininas, nepriklausomai nuo skyrimo būdo su šlapimu pasišalino beveik nepakitęs, o tulžyje buvo nustatyti keli jo metabolitai – silibinino gliukuronidai ir sulfatai, o taip pat dehidrosilibinas [45].

1.5. Tikrųjų margainių vaisių preparatų pritaikymas gydant įvairius sveikatos negalavimus

Kepenų ligos yra vienos iš pagrindinių ligų visame pasaulyje, nes pacientų, kurie turi kepenų toksinį pažeidimą, susijusį su alkoholio vartojimu ar virusines infekcijas, skaičius nuolat didėja [50]. Alkoholinė kepenų liga ir kepenų cirozė yra pagrindinės su alkoholio vartojimu susijusios sergamumo bei mirtingumo priežastys. Alkoholio vartojimas prisideda prie vidutinės tikėtinos gyvenimo trukmės trumpėjimo. Nuo alkoholio vartojimo priklausiančios mirtys Lietuvoje 2013 m. sudarė bent 4 proc. visų mirčių [51]. Alkoholiniams kepenų pažeidimams atsirasti taip pat turi reikšmės nesubalansuota mityba bei B ir C virusų infekcija. Veikdami sinergistiškai, jie greičiau ir stipriau pažeidžia kepenis, skatina ligos progresavimą, todėl greičiau susiformuoja kepenų cirozė [52]. Kepenų ligų progresavimo stadijos gali skirtis: nuo steatozės iki kepenų cirozės, ar net kepenų vėžio, tai rodo, kad didelę reikšmę turi ankstyva intervencija į įvairias kepenų ligas. Kaip pirmoji lėtinių kepenų ligų gydymo priemonė yra susilaikymas nuo alkoholio, hepatotoksinių vaistų nutraukimas, dieta ir kt. Jie dažnai negali pakeisti ar kompensuoti farmakologinės terapijos, kurios reikia, kai jau padaryta žala organams, šiuo atveju – kepenims [40]. Todėl pirmiausia turėtų itin rūpėti pirminės prevencijos priemonės, nes taikant jas galima išvengti kai kurių ligų arba gerokai sumažinti su šiomis ligomis susijusius simptomus.

Apibendrinant kepenų ląstelėse ir kitų tipų ląstelėse bendrą silibinino poveikį pažymėtina, kad šiuo metu labiausiai ištirtas silibinino antioksidacinis poveikis, kuris apibūdintas 1 lentelėje. Poveikis nulemia platų ekstrakto pritaikymą vidaus organų ligų gydymui ir profilaktikai.

1 lentelė. Antioksidacinis silimarino poveikis [53]

Dozė	Ląstelės	Taikinys
Nuo 10 iki 100 $\mu\text{mol/l}$	Hepatocitai	Sumažėjęs reaktyviųjų deguonies rūšių susidarymas iš mitochondrijų; geležies chelatorius
	HepG2	Sumažėjęs superoksido anijono susidarymas
Vidutinė dozė su dokumentacijose patvirtintu poveikiu – 20 $\mu\text{mol/l}$	Kupfferio ląstelės	Sumažėja azoto monoksido gamyba
	Monocitai	Metilo, trichlormetilo radikalų ploviklis
	Endotelio ląstelės	Vandenilio peroksido koncentracijos sumažėjimas

1.5.1. Preparatų pritaikymo galimybės įvairių ligų gydymui ir profilaktikai

Plačios silimarino pritaikymo galimybės ir jas patvirtinantys įvairūs moksliniai tyrimai pateikiami 2 lentelėje.

2 lentelė. Preparatų pritaikymo galimybės

Indikacija	Tyrimo aspektai ir išvados	Literatūros šaltinis
Inkstų ligos	Silimarinas koncentruojasi inkstų ląstelėse ir padeda ląstelėms atsinaujinti, didindamas baltymų ir nukleorūgščių sintezę. Jis padidina ląstelių replikaciją 30%. Silimarinas teigiamai veikia diabetinę nefropatiją.	[54] [55]
Psoriazė	Jis gali pagerinti psoriazinę būklę, pašalindamas nepageidaujamus metabolitus iš kūno ląstelių, ypač kepenų, taip pat slopindamas cAMP ciklą ir leukotrienų sintezę.	[56]
Odos vėžys	Įrodyta, kad silimarinas turi antiangiogeninį poveikį įvairių rūšių vėžio gydymui. Gydant odos vėžį, naudojant silimariną slopinama ultravioletinė B radiacija arba chemiškai inicijuojama ar skatinama kancerogenezė. Šis silimarino poveikis odos kancerogenezei buvo priskirtas dėl stipraus antioksidacinio ir priešūždegiminio poveikio.	[57]
Prostatos vėžys	Įrodyta, kad gydymas silimarinu mažina androgenų receptorių, epidermio augimo faktoriaus receptorių ir branduolio faktoriaus – KB tarpininkavimą ir sukelia ląstelių ciklo sustojimą, mažina metastazių atsiradimo riziką. Naudojant silimariną buvo akivaizdus apopoztinis veiksmingumas prostatos karcinomos ląstelių kultūroje ir tyrimuose su žiurkių prostatos vėžinėmis ląstelėmis.	[58]
Alerginis rinitas	Nustatyta, kad išgėrus 140 mg silimarino tris kartus per dieną 1 mėnesį, jis parodė teigiamą poveikį rinito simptomams. Teigiamas poveikis gautas dėl silimarinio antioksidacinio poveikio. Pabrėžiama, kad toks vartojimas buvo saugus ir nepageidaujamų reakcijų nepastebėta.	[59]
Preeklampsija	Tyrimo tikslas buvo įvertinti silimarino poveikį preeklampsijai ir kepenų pažeidimams, kuriuos sukelia aukštas kraujospūdis. Nustatyta, kad aspartate aminotransferazės ir alanine aminotransferazės sumažėjo, o tyrime nepastebėta jokių nepageidaujamų reakcijų	[60]
Alzheimerio liga	Autoriai padarė išvadą, kad silimarinas vartojamas 420 mg per parą, gali būti skiriamas kartu su centrinio veikimo acetilcholinesterazės inhibitoriumi ir netiesioginiu cholinerginiu agonistu takrinu, kad pagerėtų takrino tolerancija pacientams, sergantiems Alzheimerio liga. Šalutinis poveikis virškinimo traktui pasireiškė daug rečiau, kartu vartojant silimariną.	[16] [61]
Amanita phalloides apsinuodijimas	Viena iš ryškiausių silimarino vartojimo priežasčių yra Amanita phalloides apsinuodijimo metu. Šie grybai sukelia stiprų hepatotoksinį poveikį. Sunkaus kepenų pažeidimo galima išvengti silimarino skiriant per 24 val. nuo apsinuodijimo pradžios į veną, kaip priešnuodį.	[9] [34]

1.6. Silimarino poveikis žmogaus audiniuose esantiems CYP-450 ir vaistų sąveikai

Per os vartojamas silimarinas nedaro jokio reikšmingo slopinančio ar stimuliuojančio poveikio CYP-1A, CYP-2C9, CYP-2D6 ir CYP-3A4. Tai neturėjo reikšmingo poveikio nė vieno vaisto metabolizmui. Tačiau kituose tyrimuose silibininas A ir silibininas B turėjo slopinamąjį poveikį CYP2C9 ir CYP3A4. Kai kurie iš šių citochromų, tokie kaip CYP-2C9 yra veiksmingi vaisto antikoagulianto varfarino metabolizme, todėl tokius vaistus kartu reiktų vartoti atsargiai [59].

Žmonių organizme daugiausia vaisto nifedipino metabolizuoja CYP-3A4 fermentai ir sudaro jo pagrindinį piridino metabolitą – dehidronifedipiną. CYP-3A4 yra gausiausias CYP fermentas (30–40 proc.) suaugusiųjų kepenyse ir metabolizuoja daugiau nei 50 proc. kliniškai vartojamų vaistų,

įskaitant nifedipiną. Silibininas (100 µM) ir jo β-glikozidas (100 µM) nedaro įtakos CYP-1A2 ir CYP-3A4, esant bazinei ir indukuojamai ekspresijai. Kartu vartojamas 280 mg silibininas neturi reikšmingos įtakos 10 mg nifedipino farmakokinetikai. Silibinino slopinamasis poveikis CYP-3A4 tarpininkaujama metabolizmui buvo nustatytas naudojant kortizolį kaip pavyzdinį junginį siekiant parodyti, kad silibininas neslopina jokio kortizolio metabolizmo. Sridar ir kt. parodė, kad silibininas yra CYP-450s 3A4 ir CYP-2C9 – inaktyvatorius. Taigi patartina atsargiai vartoti silibininą kartu su vaistais, kurių pagrindą šalina CYP-3A4 arba CYP-2C9, nes negalima atmesti šios vaistų sąveikos.

Rosuvastatinas yra veiksmingas statinas mažinant mažo tankio lipoproteinų (MTL) cholesterolį ir didinant didelio tankio lipoproteinų cholesterolį. Vartojant silimariną, jis slopino tiek OATP1B1, tiek BCRP sukeltą rosuvastatino pernešimą *in vitro*. Tačiau atliekant tyrimus *in vivo*, silimarinas nedarė įtakos rosuvastatino farmakokinetikai, todėl manoma, kad silimarinas, vartojamas pagal rekomenduojamą režimą, nėra stiprus OATP-1B1 ar BCRP moduliatorius *in vivo* [25]. Negalima atmesti farmakokinetinės sąveikos su metronidazolu ir kitais preparatais, kuriuos metabolizuoja citochromo P450 fermentai CYP-3A ir CYP-2C9 [45]. Kadangi silimarinas paprastai vartojamas ilgą laiką, reikia ištirti ilgalaikę silimarino ir vaistų sąveiką. Silimarino preparatai turėtų būti tinkamai paženklinti, kad įspėtų vartotojus apie galimą sąveiką su kitais vaistais, kad būtų išvengta nepageidaujamų poveikių [25].

1.7. Nepageidaujamas poveikis

Atlikti tyrimai su žmonėmis parodė, kad silimarinas yra saugus ir gerai toleruojamas. Jis nėra toksiškas ir nesukelia žymių nepageidaujamų poveikių. Suaugusiems skiriama 200–900 mg dozė per parą, padalyta į dvi ar tris dalis. Didesnė dozė (>1500 mg per parą) gali sukelti nedidelius virškinimo trakto sutrikimus, pasireiškiančius silpnu vidurius laisvinančiu poveikiu, kurį sukelia padidėjusi tulžies sekrecija. Pastebimos lengvos alerginės reakcijos (niežulys, dilgėlinė ir kt.), tačiau retai. Dažniau pastebimas pilvo pūtimas, dispepsija, epigastrija, pykinimas, pakitusios išmatos, tai stebima 2–10 proc. pacientų. Be šių simptomų pastebimi galvos skausmai ir dermatologiniai simptomai [62].

Išgėrus 2500 arba 5000mg/kg dozes, nustatyta, kad silimarinas nebuvo toksiškas žiurkėms ir pelėms ir nesukėlė nepageidaujamų poveikių. Tokie pat rezultatai gauti atlikus tyrimus su šunimis ir triušiais. Galima daryti išvadą, kad silimarino ūmus toksiškumas yra labai mažas. Nustatyta, kad didesnės koncentracijos silimarinas turi slopinantį poveikį abiem I ir II fazės metabolizuojančioms fermento citochromo sistemoms. Lyginant su terapinėmis dozėmis, koncentracija plazmoje yra mažesnė nei tos dozės, kurios veikia slopinančiai. Taigi pažymėtina, kad jame nėra jokio kenksmingo poveikio vartojant preparatą normaliomis dozėmis [63].

1.8. Tikrųjų margainių vaisių biologiškai aktyvių junginių identifikavimas

Norint pritaikyti silimariną gydymo tikslams, vienas iš svarbiausių žingsnių yra išsamiai ištirti jo cheminę sudėtį, identifikuoti ekstrakte esančius junginius ir nustatyti jų kiekius. Atrankūs šiuolaikiniai analizės metodai turėtų būti naudojami nustatant silimarino junginių kiekius rinkoje esančių komercinių fitopreparatų sudėtyje. Šiuo metu silimarino komplekso ir komponentų kiekybiniam ir kokybiniam nustatymui naudojami tiek nepakankamai atranki UV ir regimojo spektro sugerties spektrofotometrija, tiek atrankesnės IR ir BMR spektroskopijos technikos, masių spektroskopija, plonasluoksnė chromatografija, efektyvioji skysčių chromatografija, dujų chromatografija, žiedinio dichroizmo spektrinė analizė bei kapiliarinė elektforezė. Iššūkiu analizės metodų metu tampa silimarino junginių panašumas savo molekuline sandara, silibininas ir

izosilibinas turi po du diastereomerus, kurie apsunkina tiek kokybinės, tiek kiekybinės sudėties analizę.

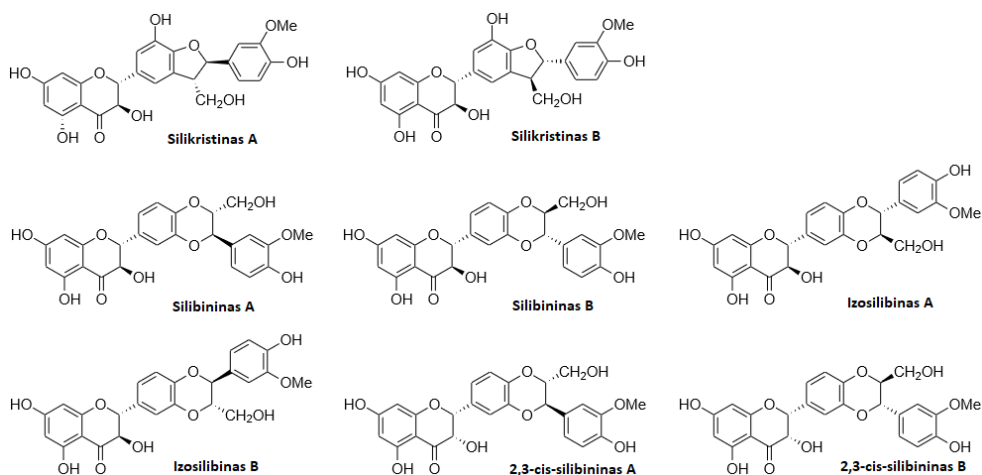
Efektvyioji skysčių chromatografija (ESCh) – yra populiariausias augalinių produktų analizės metodas. Šis metodas lengvai valdomas, aukštos rezoliucijos, visiškai automatizuotas, selektyvi ir jautri instrumentinė tyrimo technika. Vienas iš šio metodo pranašumų galimybė analizėje panaudoti įvairius detektorius [64,65]. Fitopreparatų „pirštų antspaudų“ analizei naudojami įvairūs detektoriai: ultravioletinės šviesos (UV) ir diodų matricos (DAD) – (UV) ir regimąją šviesą absorbuojantiems junginiams; šviesos sklaidos (ELSD) ir chemiluminescencinis detektorius (CL) – UV regimosios šviesos neabsorbuojantiems junginiams; šviesos sklaidos (ELSD) ir chemiluminescencinis detektorius (CL) – UV ir regimosios šviesos neabsorbuojantiems junginiams; masių spektrometrinis detektorius (MS) – atskirų junginių identifikavimui [66–68]. Mokslininkų sukurtas efektyviosios skysčių chromatografijos metodas su fotodiodų matricos detektoriumi (PDA), leido vienu metu nustatyti 6 skirtingus tikrųjų margainių vaisių veikliosios medžiagos biologiškai aktyvius junginius. ESCh analizėje naudojant skirtingus bangos ilgius, sukurtas metodas leido nustatyti biologiškai aktyvius junginius, turinčius puikų atsparumą, tikslumą. Analizės metu buvo nustatyti „pirštų antspaudai“ devyniuose skirtingų kultūrinių regionų ir sezonų mėginiuose Kinijoje. Metodo trūkumai, kad reikalinga gana brangi įranga ir naudojami dideli kiekiai aplinkai kenksmingų skysčių. Svarbu paminėti, kad „pirštų antspaudų“ nustatymui reikšmingas analitinis veiksnys – nejudriosios ir judriosios fazių parinkimas. Dažniausiai augalinių preparatų „pirštų antspaudų“ analizei naudojama dalelių pagrindo C18 (oktadecilsilikilageliu užpildyta) kolonėlė. Šių kolonelių efektyvumas priklauso nuo jų dalelių dydžio (3–5 μm) [69].

UV spektrofotometrija (UV) – taikoma, kaip vienas iš paprasčiausių detekcijos metodų silimarino komponentų kiekybinei analizei po chromatografinio skirstymo. Metodas pagrindžiamas silimarino geru tirpumu metanolyje ir prie 287–288 nm bangos ilgio nustatytu absorbcijos maksimumu. Šio metodo privalumai yra tikslumas ir pakartojamumas, tačiau šis metodas nenaudojamas silimarino biologiškai aktyvių junginių identifikavimui [70].

Skysčių chromatografijos kombinacija su masių spektrometrija (SC/MS) – kitas metodas silimarino biologiškai aktyviems junginiams nusatyti ekstraktuose ir standartizuotuose tirpaluose. Šiam metodui junginiams atskirti naudojama ESC C18 kolonėlė, kartu su kvadupoliniu gaudyklės ar praskiejimo laiko masių spektrometru. Nors metodo trūkumas yra sudėtingos įrangos reikalaujanti technika, tačiau jis gali tapti vienu iš svarbiausių augalinių vaistinių preparatų naudojamų metodų dėl savo galimybės nustatyti skirtingus izomerus [71].

Skysčių chromatografija su tandemine masių spektrometrija (SC/MS/MS) – metodas, kuris naudojamas pagrindinių silimarino biologiškai aktyvių junginių analizei. Šio metodo privalumas, kad parinkus ypatingai atrankias sąlygas galima atskirti ne tik silimarino biologiškai aktyvius junginius, bet ir jų izomerus [72].

Silimarinas yra flavonolignanų mišinys, įskaitant silikristiną A ir B, silidianiną, silibinus A ir B bei izosilibinus A ir B kaip pagrindines bioaktyvias sudedamąsias dalis. Taip yra nustatyta, kaip silimarino biologiškai aktyvūs junginiai – 2,3-cis-silibininas A ir B [73].



5 pav. Silimarino biologiškai aktyvių junginių izomerai

Dėl plataus medicininių ir maistinių silimarino fitopreparatų vartojimo svarbu sukurti labai jautrius ir veiksmingus metodus, galinčius identifikuoti ir kontroliuoti visus silimarino pagrindinius komponentus. Tyrimų metu nustatyta, kad taikoma tandeminė MS, įgalina gauti silimarino struktūrinę informaciją ir efektyviai atskirti izomerinius flavonolignanų [73,74].

1.9. Apibendrinimas

Tradicinėje medicinoje margalapių margainių preparatai naudojami tūkstančius metų žmonių ligų profilaktikai ir gydymui. Nuolat auganti augalinių produktų pramonė ir reglamentų bei teisės aktų trūkumas kelia Pasaulinės sveikatos organizacijos (PSO) ir kitų reguliavimo institucijų susirūpinimą dėl augalinių maisto papildų ir vaistinių preparatų saugumo ir veiksmingumo. Nors margalapių margainių ir silimarino produktai yra gana plačiai vartojami, tačiau jų sudėties įvairavimas mažai tirtas. Literatūros šaltiniuose skelbta tik pavienių mokslinių tyrimų rezultatų apie augalinių žaliavų, maisto papildų ar vaistinių preparatų, kurių sudėtyje yra silimarino ruošiniai, turinio variacijos ribas. Vienas iš pagrindinių kokybės kriterijų šaltinių yra Europos farmakopėja ir kitų regionų (kaip JAV) farmakopėjos, kuriose paskelbta daug monografijų apie augalinių medžiagų kokybės kontrolę. Norint įvertinti silimarino farmakologinio efekto atkuriamumą aktualu atlikti augalinės žaliavos analizę bei įvertinti veikliųjų medžiagų kokybinę ir kiekybinę sudėtį. Remiantis įvairiais moksliniais straipsniais silimarino ir jo komponentų identifikavimas ir kiekybės bei kokybės kontrolė gali būti atliekama taikant chromatografinius metodus, masių spektrometriją, efektyviają skysčių chromatografiją. Šio tyrimo metu pasirinkta ultra efektyvioji skysčių chromatografija. Tai tikslus, greitas, jautrus ir informatyvus metodas [5,6]. Kadangi dalis silimarino preparatų gamintojų praturtina savo produktus kitais ingredientais ir ženklindami produktą apsiriboja tik silimarino procentiniu kiekiu, nenurodydami tikslios preparato sudėties, todėl šio tyrimo metu panaudotas dar vienas papildomas analizės metodas ultra efektyvioji skysčių chromatografija – tandeminė masių spektrometrija. Tyrimo rezultatai leidžia identifikuoti atskirus komponentus, esančius fitopreparatuose, o kartu ir patikimai kokybiškai patvirtinti silimarino tapatybę produktuose.

2. MEDŽIAGOS IR TYRIMŲ METODAI

2.1. Tyrimo objektas

Tyrimas atliktas analizuojant Lietuvos visuomeninių vaistinių asortimento įvairiems kepenų sutrikimams skirtų augalinių maisto papildų ir vaistinių preparatų sudėtis. Pasirinkti preparatai, kurių pagrindinė sudedamoji dalis valyti ir kiekybiškai įvertinti sausieji *Silybum marianum* L. vaisių (žaliava atitinka Europos farmakopėjos monografiją 01/2014:2071) ekstraktai ir ruošiniai. Tyrimui pasirinkti 5 vienkomponenčiai preparatai, kurių sudėtyje viena pagrindinė vaistinė ar maistinė medžiaga – tikrųjų margainių vaistinė augalinė žaliava ir 5 daugiakomponenčiai preparatai, kurių sudėtį be tikrojo margainio vaistinės augalinės žaliavos papildė ir kiti komponentai, tokie, kaip vitaminai tokoferolis, askorbo rūgštis, siauralapio gysločio, puikiųjų bijūnų šaknų, vaistinės medetkos, didžiosios dilgėlės, piperino (iš juodųjų pipirų vaisių) augalinių žaliavų ekstraktai. Vaistinė medetka palaiko normalią kepenų ir žarnyno veiklą, o didžioji dilgėlė padeda palaikyti normalią imuninės sistemos veiklą ir organizmo gyvybingumą ir taip papildė silimarino pagrindinį poveikį kepenų funkcijai. Eksperimentiniam tyrimui pasirinkti nereceptiniai vaistiniai preparatai ir maisto papildai atitinkamai yra nurodyti 3 lentelėje.

3 lentelė. Komerčių fitopreparatų žymėjimas (atsitiktinė tvarka), kurie naudojami tyrimams atlikti

Eil. nr.	Žyma	Fitopreparato tipas
1	NV1	Nereceptinis vaistinis preparatas
2	NV2	Nereceptinis vaistinis preparatas
3	NV3	Nereceptinis vaistinis preparatas
4	NV4	Nereceptinis vaistinis preparatas
5	NV5	Nereceptinis vaistinis preparatas
6	MP1	Maisto papildas
7	MP2	Maisto papildas
8	MP3	Maisto papildas
9	MP4	Maisto papildas
10	MP5	Maisto papildas

Fitopreparatų sudėtys buvo sugrupuotos atsižvelgiant į produkto grupę. Produktų sudėčių sąrašas pateiktas atsitiktine tvarka (nuo gamintojo nepriklauso):

- **Nereceptinis vaistinis preparatas – NV1. Sudėtis.** Vaistinė medžiaga silimarinas. Vienoje kietojoje kapsulėje yra 200–275 mg (margainių vaisių) rafinuoto ir standartizuoto sausojo ekstrakto (35-50:1), atitinkančio 110 mg silimarino, išreikšto silibininu. Ekstrakcijos tirpiklis: metanolis 98 proc. **Pagalbinės medžiagos. Tabletės branduolys:** laktozės monohidratas, kviečių krakmolai, povidonas K25, mikrokristalinė celiuliozė, talkas, magnio stearatas, gliukozės monohidratas, sorbitolis (E420), natrio-vandenilio karbonatas. **Tabletės dangalas:** celiuliozės acetatas-ftalatas, dietilo ftalatas, sacharozė, gumiarabikas, želatina, titano dioksidas (E171), makrogolis 6000, Opalux AS 26589 Brown (sacharozė, išgrynintas vanduo, raudonasis geležies oksidas (E172), juodasis geležies oksidas (E172), metilo parahidroksibenzoatas (E218), propilo parahidroksibenzoatas (E216)), glicerolis.

- **Nereceptinis vaistinis preparatas – NV2. Sudėtis.** Vaistinė medžiaga silimarinas. Vienoje dengtoje tabletėje yra 40,9–56,3 mg (margainių vaisių) rafinuoto ir standartizuoto sausojo ekstrakto (35-50:1), atitinkančio 22,5 mg silimarino, išreikšto silibininu. Ekstrakcijos tirpiklis: metanolis 98 proc. (V/V). **Pagalbinės medžiagos. Tabletės branduolys:** laktozės monohidratas, kviečių krakmolas, povidonas K25, mikrokristalinė celiuliozė, talkas, magnio stearatas, gliukozės monohidratas, sorbitolis (E420), natrio-vandenilio karbonatas. **Tabletės dangalas:** celiuliozės acetatas-ftalatas, dietilo ftalatas, sacharozė, gumiarabikas, želatina, titano dioksidas (E171), makrogolis 6000, Opalux AS 26589 Brown (sacharozė, išgrynintas vanduo, raudonasis geležies oksidas (E172), juodasis geležies oksidas (E172), metilo parahidroksibenzoatas (E218), propilo parahidroksibenzoatas (E216)), glicerolis.
- **Nereceptinis vaistinis preparatas – NV3. Sudėtis.** Vaistinė medžiaga silimarinas. Kiekvienoje kietojoje kapsulėje yra: 215,38–350 mg (margainių vaisių) rafinuoto ir standartizuoto sausojo ekstrakto (22-27:1), atitinkančio 140 mg silimarino, apskaičiuoto pagal silibininą. Ekstrakcijos tirpiklis: acetonas: vanduo (95:5). **Pagalbinės medžiagos. Kapsulės turinys:** bevandenis kalcio-vandenilio fosfatas, karboksimetilkrakmolo A natrio druska, talkas, magnio stearatas, bevandenis koloidinis silicio dioksidas. **Kapsulės korpusas:** želatina, titano dioksidas (E171), raudonasis geležies oksidas (E172).
- **Nereceptinis vaistinis preparatas – NV4. Sudėtis.** Vienoje dengtoje tabletėje yra 275–375 mg (margainių vaisių) rafinuoto ir standartizuoto sausojo ekstrakto (30:1), atitinkančio 150 mg silimarino, apskaičiuoto pagal silibiną. Ekstrakcijos tirpiklis: acetonas. **Pagalbinės medžiagos. Tabletės branduolys:** izomaltas, povidonas, pregelifikuotas krakmolas, kroskarmeliozės natrio druska, bevandenis koloidinis silicio dioksidas, magnio stearatas. **Tabletės dangalas:** Opadry Clear 03K19229:hipromeliozė, triacetinas (E 1518), talkas (E 553b)).
- **Nereceptinis vaistinis preparatas – NV5. Sudėtis.** Kiekvienoje plėvele dengtoje tabletėje yra (margainių vaisių) rafinuoto ir standartizuoto sausojo ekstrakto (30:1), atitinkančio 35 mg silimarino, apskaičiuoto pagal silibiną. Ekstrakcijos tirpiklis – acetonas. **Pagalbinės medžiagos. Tabletės branduolys:** pregelifikuotas kukurūzų krakmolas, povidonas, izomaltas (E953), kroskarmeliozės natrio druska, bevandenis koloidinis silicio dioksidas, magnio stearatas. **Tabletės dangalas:** Opadry skaidrus 03K19229: hipromeliozė 2910 , triacetinas, talkas.
- **Maisto papildas – MP1. Sudėtis.** Kiekvienoje kapsulėje yra tikrųjų margainių ekstrakto 187,5 mg, kuriame silimarino yra 150 mg, daržinių artišokų ekstrakto 10 mg, paprastųjų kiaulpienių žolės ir šaknų ekstrakto 10 mg , paprastojo saldymedžio šaknų ekstrakto 5 mg. **Pagalbinės medžiagos.** Saulėgrąžų aliejus, želatina, drėgmę išlaikanti medžiaga glicerolis ir bičių vaškas, lipnumą reguliuojančios medžiagos lecitinas ir riebalų rūgštys, dažikliai – geležies oksidas.
- **Maisto papildas – MP2. Sudėtis.** Vienoje kapsulėje silimarino iki 22,5 mg. **Pagalbinės medžiagos.** Lipnumą reguliuojanti medžiaga celiuliozė, želatina, laktozės monohidratas, lipnumą reguliuojančios medžiagos: talkas, riebalų rūgščių magnio druskos ir silicio dioksidas, dažikliai geležies oksidai ir titano dioksidas.
- **Maisto papildas – MP3. Sudėtis.** Vienoje kapsulėje yra tikrųjų margainių vaisių ekstrakto 45 mg, askorbo rūgšties 30 mg, tokoferolio 10 mg, piridoksino B6 1,4 mg. **Pagalbinės medžiagos.** Lipnumą reguliuojančios medžiagos: celiuliozė, želatina, kalcio fosfatas, talkas,

riebalų rūgščių magnio druskos ir silicio dioksidas, dažikliai geležies oksidai ir titano dioksidas.

- **Maisto papildas – MP4. Sudėtis.** Viename pakelyje silimarino 105 mg, iš tikrojo margainio mufa mononesočiųjų riebalų rūgščių 0,065 g, pufa polinesočiųjų riebalų rūgščių 0,195 g, alfa-linolenoleno 0,005 g, alfa-linolo 0,18 g, maistinių skaidulų skaidulinės medžiagos 1,6 g, tokoferolio 0,21 mg. **Pagalbinės medžiagos.** Sudėtyje nėra konservantų, stabilizatorių, kvapiųjų medžiagų, saldiklių ar dažiklių.
- **Maisto papildas – MP5. Sudėtis.** Vienoje kapsulėje tikrųjų margainių sėklų ekstraktas 112,5 mg, kuriame silimarino 90 mg, dažinių ciberžolių šaknų ekstraktas 100 mg, kuriame kurkumino 70 mg, puikiųjų bijūnų šaknų milteliai 25 mg, vaistinių medetkų žiedų ekstraktas 25 mg, siauralapių gysločių žolės ekstraktas 25mg, didžiųjų dilgelių lapų milteliai 10 mg, juodųjų pipirų vaisių ekstraktas 2,5 mg, kuriame piperino 2,4 mg. **Pagalbinės medžiagos. Kapsulės apvalkalas:** želatina, dažikliai – titano dioksidas, geležies oksidas ir indigotinas. Lipumą reguliuojančios medžiagos – mikrokristalinė celiuliozė, silicio dioksidas, riebalų rūgščių magnio druskos ir talkas.

Šiais pasirinktais preparatais siekiama palyginti maisto papilduose ir nereceptiniuose vaistiniuose fitopreparatuose su tikrųjų margainių ekstraktais sudėties kokybę.

2.2. Eksperimentiniam tyrimui naudoti reagentai

1. **Metanolis. Metilo alkoholis.** CH_4O (Mr 32,04). [CAS Nr. 67-56-1]. Skaidrus, bespalvis, degus skystis, maišosi su vandeniu ir etanolu (96 proc.). Įsigyta iš „Sigma – Aldrich“ (Buchsas, Šveicarija). Laikyta originalioje talpykloje kambario temperatūroje.
2. **Acetonitrilas. Metilo cianidas.** $\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$ (Mr 41,05). [CAS Nr. 75-05-8]. Skaidrus, bespalvis skystis, maišosi su vandeniu, acetonu ir metanolu. Įsigyta iš „Sigma – Aldrich“ (Buchsas, Šveicarija). Laikyta originalioje talpyklėje kambario temperatūroje, gerai vėdinamoje vietoje.
3. **Skrudžių rūgštis. Metano rūgštis.** CH_2O_2 (Mr 46,03). [CAS Nr. 64-18-6]. Įsigyta iš „Sigma – Aldrich“ (Buchsas, Šveicarija). Laikyta originalioje talpyklėje kambario temperatūroje, gerai vėdinamoje vietoje.
4. **Trifluoracto rūgštis.** CF_3COOH (Mr 114,02). [CAS Nr. 76-05-1]. Įsigyta iš „Sigma – Aldrich“ (Buchsas, Šveicarija). Laikyta originalioje talpyklėje kambario temperatūroje, gerai vėdinamoje vietoje.
5. **Dejonizuotas vanduo.** H_2O (Mr 18,02). Gamintas laboratorijoje laboratorijoje vandens gryninimo sistema Millipore/Milli-Q, kontroliuojant laidžio rodiklį. Laikyta vandens gryninimo sistemos talpykloje kambario temperatūroje. Patalpintas laboratorinio stiklo talpyklose chromatografiniam tyrimui (kaip judančios fazės komponentas) kambario temperatūroje laikytas 24 val.
6. **Fosforo rūgštis.** H_3PO_4 (Mr 97,944). Reagento numeris farmakopėjoje 1069600 [CAS Nr. 7664-38-2]. Įsigyta iš „Sigma – Aldrich“ (Buchsas, Šveicarija). Atitinka farmakopėjos monografiją „Koncentruota fosforo rūgštis“ (3333). Laikyta originalioje talpykloje kambario temperatūroje.
7. **Standartizuoto sausojo margalapių margainių etaloninė medžiaga HRS.** EDQM kodas: Y0000167; [CAS Nr. 22888-70-6]. Laikoma originalioje talpyklėje $-20^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$ temperatūroje, apsaugotoje nuo šviesos vietoje. Talpyklė atidaroma tik prieš atliekant tyrimą, nes junginys nestabilus. Atidarius talpyklę, medžiaga tampa nebetinkama naudoti kitam tyrimui.

2.3. Maisto papildų ir nereceptinių vaistinių preparatų mėginių paruošimas tiriamajam tirpalui

Prieš atliekant silimarino ekstrakciją iš maisto papildų bei nereceptinių vaistinių preparatų matricų, skirtingų farmacinių formų preparatai skirtingai apdorojami ir jų turinys perkeliamas į matavimo kolbas. Preparatai, kurių farmacinė forma tabletės, buvo sutrinami grūstuvėje iki homogeniškų miltelių pavidalo, kietos kapsulės išardomos, minkštos kapsulės vienas galas smeigtuku praduriamas ir turinys išspaudžiamas, o granulės beriamos tiesiai į pasirinktiną laboratorinį indą.

2.4. Tyrimo metodai

Atliekant preparatų tyrimus dėl objekto kompleksiskumo taikyti efektyvūs chromatografiniai metodai. Analitiniais tikslais remtasi Europos farmakopėjos monografija „Standartizuotas standartizuoto margalapių margainių vaisių ekstraktas“. Kiekybės tyrimui palyginamasis tirpalas ruoštas pagal farmakopėje nurodytas metodologines sąlygas, tiriamasis tirpalas – taikant nedaug modifikuotas sąlygas. Kiekybės rodiklių apskaičiavimui taikyta farmakopėjinė metodika.

2.4.1. Silimarino identifikavimas

Augalinių vaistinių preparatų ir maisto papildų sudėtyje gali būti dešimtys ar šimtai įvairių junginių, nepaisant to, kad daugelio iš jų koncentracija yra maža. Jų terapinis veiksmingumas pagrįstas sudedamųjų komponentų tarpusavio sąveika, o tai svarbu preparatų kokybei, veiksmingumui, saugai. Norint įvertinti veikliųjų medžiagų kiekius bei visą profilį chromatografija įgalina atskirti labai platų organinių junginių spektrą, nuo mažos molekulinės masės vaistų metabolitų iki peptidų ir baltymų. Analizuojant mokslinę literatūrą, randama ne vienas iš metodų identifikuoti pagrindinius *Silybum marianum L.* komponentus: spektrofotometrija, efektyvioji skysčių chromatografija, ultra efektyvioji skysčių chromatografija, dujų chromatografija, masių spektrometrija, kapiliarinė elektroforezė, UV absorbcinė spektrofotometrija.

2.4.2. Silimarino komercinių fitopreparatų kiekybinis identifikavimas efektyviosios skysčių chromatografijos (ESCh) metodu

Silimarino išreikštu silibininu tikrųjų margainių vaisių ekstraktuose (atitinka 2071 Europos farmakopėjos monografiją) analizė atlikta remiantis Europos farmakopėja. Šis metodas dažniausiai naudojamas tiek fenolinių junginių atskyrimui, tiek junginių kiekio nustatymui. Yra daug faktorių, kurie įtakoja flavonolignanų analizę taikant šį metodą: mėginio gryninimas, judri fazė, kolonėlių tipas bei detektoriai. Gradientinė eliucija paprastai atliekama naudojant dvikomponentę tirpiklių sistemą: metanolis arba acetonitrilas kaip organinis modifikatorius. Nustatyti dominuojančius flavonoidus mėginyje pakanka 30–60 min., kad būtų atskirti nuo 5 iki 10 junginių [75].

Tiriamąjį tirpalą ruošimas. Tyrimui svaryklėmis atsveriamas tabletės ar kitos formos preparato turinio kiekis, atitinkantis 15 mg (nustatoma pagal ženklinimo duomenis) tikrųjų margainių vaisių ekstrakto. Ėminys maišant tirpinamas 8 ml metanolyje skiedimo kolbutėje, ekstrahuojama. Laikoma 5 min. ultragarso vonelėje ir 15 min. kambario temperatūroje. Prieš analizę mėginys filtruojamas per 0,2 μm porų dydžio filtrą. Kitoje 10 ml stiklinėje kolboje nufiltruotas tirpalas praskiedžiamas metanoliu iki žymės. Tiriamas tirpalas tokiu metodu ruoštas visiems 10 atrinktų preparatų ir naudojamas analizei.

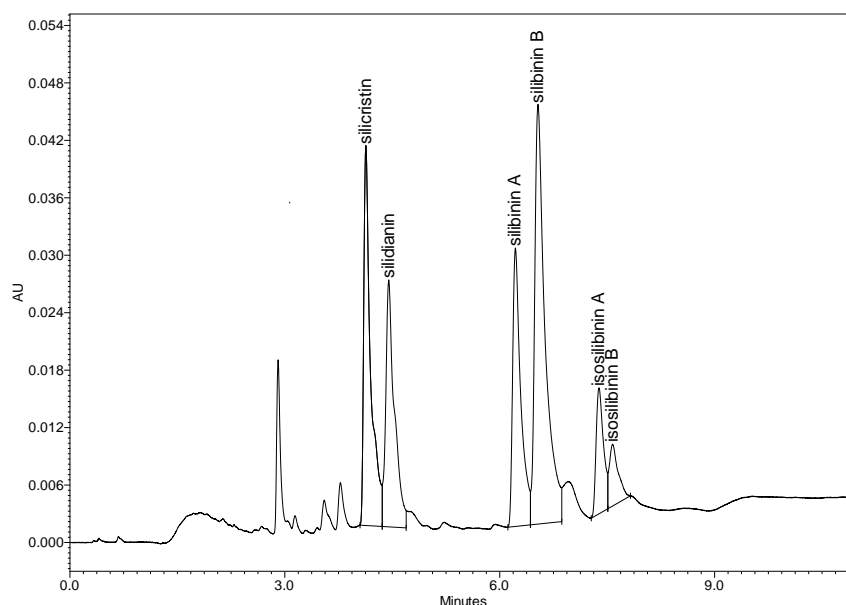
Šios analizės metu chromatografiniai skirstymui buvo naudotas skysčių chromatografas „Waters ACQUITY H-class UPLC“ su diodų matricos detektoriumi „ACQUITY UPLC eLambda 800 nm“. Eksperimentiniam junginių atskyrimui naudojama analitinė kolonėlė – „ACQUITY UPLC BEH C18“ 2,1x50mm (Waters), sorbento dalelių dydis 1,7 μm, aplinkos temperatūra – 30 °C. Injekcijos tūris – 1 μl.

Kiekybiniam skirstymui taikomas judrios fazės gradientas. Judriosios fazės A sudėtis: dejonizuotas vanduo. Kitas judriosios fazės B sudėtis: fosforo rūgšis R, metanolis R, vanduo R (0,5:35:65 V/V/V). Judrios fazės srauto debitas – 0,4 ml/min. Gradientinis judrios fazės kompozicijos kitimas pateiktas apačioje esančioje lentelėje (žr. 5 lentelė)

5 lentelė. Gradientinis judrios fazės kompozicijos kitimas

Laikas (min.)	Judančioji fazė A (proc. V/V)	Judančioji fazė B (proc. V/V)
0,00	100	0
0,20	100	0
1,00	40	60
8,00	0	100
10,00	0	100
11,00	100	0

Ultravioletinės šviesos absorbcijos įvertinimui eliuato tirpale spektrofotometriniu būdu naudota 288,0±1,2 nm UV absorbcijos sritis. Detektoriaus nuskaitymo dažnis atitinkamai 80 taškų per sekundę. Spektriniai duomenys buvo rinkti 210–400 nm intervale. Kaip kiekybinis rodiklis buvo vertintas analičių smailių plotas. Statistiniai rodikliai įvertinami ir duomenys apdorojami su „Empower 3“ (Waters) programine įranga. Kiekvieno tirpalo tyrimo pakartojamumas – 3 kartai. Etalono medžiagos palyginamojo tirpalo chromatograma pateikta 6 paveiksle.



6 pav. Pamatinio tirpalo chromatograma (pažymėtos smailės: „silicristin“ – silikristinas, „silidianin“ – silidianinas, „silibinin A“ – silibininas A, „silibinin B“ – silibininas B, „isosilibinin A“ – izosilibininas A, „silibinin B“ – izosilibininas B)

Rezultatų patikrinimui ir palyginamajam įvertinimui buvo naudotas alternatyvus skirstymo metodas, kurio skirstymo rodikliai buvo pasirinkti atitinkamai. Skirstymui taikomas judrios fazės gradientas, sudarytas iš 0,1 proc. trifluoracto rūgšties vandeninio tirpalo (eliuentas A) ir acetonitrilo (eliuentas B). Gradientinio tirpalų srauto debitas – 0,3 ml/min. Gradientinis judrios fazės kompozicijos kitimas pateiktas apačioje esančioje lentelėje (žr. 6 lentelė).

6 lentelė. Gradientinis judrios fazės kompozicijos kitimas

Laikas (min.)	Judančioji fazė A (proc. V/V)	Judančioji fazė B (proc. V/V)
0,00	100	0
20,00	30	70
21,00	0	100
22,00	100	0

Eksperimentinio tyrimo rezultatai ir analizė

Kiekybinis tiriamųjų maisto papildų ir nereceptinių vaistinių augalinių preparatų silimarino koncentracijos nustatomos pagal chromatografinių smailių plotus:

- Silimarino procentinis kiekis ekstrakto, išreikštas silibininu taikant formulę:

$$\frac{(A_1 + A_2 + A_3 + A_4 + A_5 + A_6) \times m_1 \times p}{(A_7 + A_8) \times m_2}$$

- Silimarino kiekis, išreikštas suminiu procentiniu silikristino ir silidianino procentiniu kiekiu ekstrakto, taikant formulę:

$$\frac{(A_1 + A_2) \times 100}{A_1 + A_2 + A_3 + A_4 + A_5 + A_6}$$

- Silimarino kiekis, išreikštas suminiu procentiniu silibinino A ir silibinino B procentiniu kiekiu ekstrakto, taikant formulę:

$$\frac{(A_3 + A_4) \times 100}{A_1 + A_2 + A_3 + A_4 + A_5 + A_6}$$

- Silimarino kiekis, išreikštas suminiu procentiniu izosilibinino A ir izosilibinino B procentiniu kiekiu ekstrakto pagal formulę:

$$\frac{(A_5 + A_6) \times 100}{A_1 + A_2 + A_3 + A_4 + A_5 + A_6}$$

- A₁ – silikristino smailės plotas tiriamojo tirpalo chromatografijoje;
- A₂ – silidianino smailės plotas tiriamojo tirpalo chromatografijoje;
- A₃ – silibinino A smailės plotas tiriamojo tirpalo chromatografijoje;
- A₄ – silibinino B smailės plotas tiriamojo tirpalo chromatografijoje;
- A₅ – izosilibinino A smailės plotas tiriamojo tirpalo chromatografijoje;
- A₆ – izosilibino B smailės plotas tiriamojo tirpalo chromatografijoje;
- A₇ – silibinino A smailės plotas pamatinio tirpalo chromatografijoje;

- A₈** – silibinino B smailės plotas pamatinio tirpalo chromatografijoje;
m₁ – tikrųjų margainių vaisių HRS ekstrakto masė gramais naudota pamatinio tirpalo ruošimui;
m₂ – analizuojamo ekstrakto masė gramais, naudotas tiriamojo tirpalo paruošimui;
p – procentinis silibinino A ir silibinino B kiekis etaloninėje medžiagoje.

2.4.4. Silimarino komercinių fitopreparatų kokybinis identifikavimas ultra efektyviosios skysčių chromatografijos – tandeminės masių spektrometrijos (UESCh – MS) metodu

Norint analizuoti organinius junginius, masių spektrai naudojami ne tik molekulių masei, o ir struktūrai nustatyti. Metodas yra jautrus, todėl spektrui registruoti reikia nedaug medžiagos. Masių spektrometrą sudaro: bandinio įleidimas, jonų susidarymas, jonų atskyrimas ir registravimas.

Tiriamojo tirpalo ruošimas. Tyrimui svaryklėmis atsveriamas tabletės kiekis, atitinkantis 15 mg tikrųjų margainių vaisių ekstrakto. Ėminys maišant tirpinamas 8 ml metanolyje R skiedimo kolbutėje, ekstrahuojama. Laikoma 5 min. ultragarso vonelėje ir 15 min. kambario temperatūroje. Prieš analizę mėginys filtruojamas per 0,2 μm porų dydžio filtrą. Kitoje 10 ml stiklinėje kolboje nufiltruotas tirpalas praskiedžiamas metanoliu iki žymės. Tiriamas tirpalas tokiu metodu padaromas visiems 10 atrinktų preparatų ir naudojamas analizei.

Pamatinio tirpalo paruošimas. Metanolyje R ištirpinamas tikrojo margainio sausasis CRS ekstraktas chromatografinių smailių identifikavimui, atitinkantis 10 mg silibinino, ir 100 ml skiedimo kolbutėje praskiedžiamas tuo pačiu tirpikliu iki žymės. Prieš analizę mėginys filtruojamas per 0,2 μm porų dydžio filtrą.

Kokybinė flavonolignanų ir fenolinių junginių analizė margainio ekstraktuose atlikta UESCh/MS metodu. Šiai analizei naudotas Acquity H – class („Waters“, Milfordas, MA, JAV) skysčių chromatografas su Xevo TQD masių spektrometru („Waters“, Milfordas, MA, JAV). Ekperimentiniam junginių atskyrimui naudojama analitinė YMC Triart C18 (100Å, 1,9 μm 100 x 2,0 mm) („YMC“, Kiotas, Japonija) kolonėlė su prieškolonėle. Kolonėlė laikoma termostate, jame palaikoma pastovi 40 °C temperatūra. Kokybiniam analizės metodui sudaromos dvi mobiliosios fazės – A ir B. Pirmosios, judriosios fazės A komponentai: fosforo rūgštis R, metanolis R, vanduo R (0,5:35:65 V/V/V). Judriosios fazės B komponentai: fosforo rūgštis R, metanolis R, vanduo R (0,5:50:50 V/V/V).

Pradinės eliuacijos sąlygos sudaromos taip: 95 proc. A ir 5 proc. B išlaikomos 1 min. Iki 5 min. kinta iki 70 proc. A, 7 min kinta iki 50 proc. A. 7,5 – 8 min išlaikoma 0 proc. A tirpiklio, 8,1 grąžinama į pradinės sąlygas. Bendra gradientinės eliuacijos trukmė – 10 min. Nustatomas 0,5 ml/min eliuentų tekėjimo greitis ir 1 μl injekcijos tūris. Masių spektrometro parametrai: neigiama elektropurkštuvinė jonizacija, kapiliaro įtampa 2500 V, jonų šaltinio temperatūra nustatyta 150 °C, eliuento išgarinimo temperatūra 500 °C, eliuento išgarinimo dujų tėkmės greitis – 800 l/val. Tyrimo metu gautų flavonoidų chromatografinės smailės identifikuotos pagal analitės bei etaloninio junginio sulaikymo trukmę (R_t) ir masių spektrometriniu detektoriumi gautus etanolinių junginių ir analičių masių spektrus. Chromatografinės smailės identifikuotos taikant daugialypių reakcijų stebėsenos (MRM) bei skenavimo režimus. MRM sąlygos parinktos naudojant etalonines medžiagas ir „IntelliStart“ (Waters) programinę įrangą. MS skenavimas vykdomas intervale nuo 90 m/z iki 1000 m/z. Skenavimo dažnis 0,25 s arba 4 taškai per sekundę. Kūgio įtampa 30V.

2.5 Duomenų analizės metodai

1. Teorinis analizės metodas: apžvelgti ir aprašyti moksliniai straipsniai bei tyrimai, susiję su magistriniame darbe analizuojama tema.
2. Statistiniai tyrimo metodai: gauti tyrimų metu rezultatai apdoroti naudojant Microsoft Excel 2013 programą. Ši programa naudota susisteminti duomenis, apskaičiuoti vidurkius, standartinius nuokrypius, statistinius reikšmingumus ir nubraižyti grafikus.

3. TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Fitopreparatų kiekybinė ir kokybinė analizė su tikrųjų margainių vaisių ruošiniais atlikta siekiant įvertinti skirtingų fitopreparatų cheminės sudėties ypatumus. Tyrimams atlikti naudotos dvi metodikos: kokybinis komercinių silimarino fitopreparatų nustatymas ultra efektyviosios skysčių chromatografijos – tandeminės masių spektrometrijos metodu, kiekybinis – ultra efektyviosios skysčių chromatografijos metodu. Parinktos tyrimo metodikos ir sąlygos tyrimų verifikavimui, vadovaujantis Europos farmakopėjos monografija ir kitų tyrėjų atliktais moksliniais eksperimentais. Analizės metu tirta 10 fitopreparatų, tiriamieji tirpalai analizuojami po tris kartus.

3.1. Kokybinis komercinių silimarino fitopreparatų nustatymas ultra efektyviosios skysčių chromatografijos – tandeminės masių spektrometrijos (UESCh – MS) metodu

Tyrimui pasirinkti fitopreparatai, kurių ženklime nurodytas tikrųjų margainių vaisių ekstraktas. Norint produktų mėginiuose identifikuoti pagrindinius silimarino biologiškai aktyvius junginius – žymenis pirminiame eksperimentinio tyrimo etape, buvo pritaikytas kokybinis ultra efektyviosios skysčių chromatografijos – masių spektrometrijos metodu. Moderniausi analizės metodai yra pagrįsti flavonolignanų aptikimu ultra efektyviosios skysčių chromatografijos – tandeminės masių spektrometrijos metodu. Metodo pranašumas yra tas, kad lyginant su kitais metodais, kurie neatskleidžia jokios analitės struktūrinės informacijos, masių spektrinė informacija leidžia patikimai identifikuoti atskirus komponentus [76]. Šis metodas orientuotas į bendrą biologiškai aktyvių medžiagų aptikimą ir patikimą identifikavimą, kai yra sudėtingas mišinys ir jame reikia identifikuoti atskirus komponentus. Pagrindinį metodo pasirinkimo aspektą galima priskirti ir pakankamai trumpą analizės atlikimo laiką [77].

Atliktos chromatografinės analizės metu nustatyta, kokie komponentai dominuoja skirtinguose silimarino fitopreparatuose. Vykdamas kokybinę tikrųjų margainių vaisių preparatų analizę, labai svarbu identifikuoti visus silimarino biologiškai aktyvius junginius, panaudojant Europos farmakopėje nurodytą etaloną, ir taip įvertinti fitopreparatų kokybinį profilį.

Tirtuose mėginiuose esantys flavonolignanai ir fenoliniai junginiai identifikuoti UESCh – MS metodu, lyginant standartinių tirpalų ir tiriamųjų mėginių junginių sulaikymo laikus, MS spektro duomenis, molekulinės masės su etaloninių junginių spektriniais duomenimis. Darbe atsitiktine tvarka aptariami 4 fitopreparatai, kurie pasižymėjo būdingu chromatografiniu profiliu. Aptariami ir pateikiami fitopreparatų būdingų junginių sulaikymo laikai, kurių farmacinė forma skiriasi, analizei pasirinktos plėvele dengtos tabletės, kapsulės, granulės. Fitopreparatų komponentų m/z reikšmės palygintos su nustatytomis tiriant standartų tirpalus ir pamatinį tirpalą. Gautos reikšmės palygintos su moksliniuose šaltiniuose pateiktomis m/z reikšmėmis būdingomis tikrųjų margainių vaisių žaliavoms, todėl galima patvirtinti, jog nagrinėti fitopreparatai priklauso tikrųjų margainių vaisių žaliavos turintiems preparatams [95,96].

3.1.1. Flavonolignanų kokybinis nustatymas ultra efektyviosios skysčių chromatografijos tandeminės – masių spektrometrijos (UESCh – MS) metodu

Šiuo metodu analizuoti 10 komercinių fitopreparatų, kurių sudėtyje yra pagrindinė veiklioji medžiaga silimarinas: 5 nereceptiniai vaistiniai preparatai ir 5 maisto papildai. MS analizei buvo pasirinktas neigiamas jonizacijos režimas, nes šiame jonizacijos režime geriau jonizuojasi flavonoidai ir

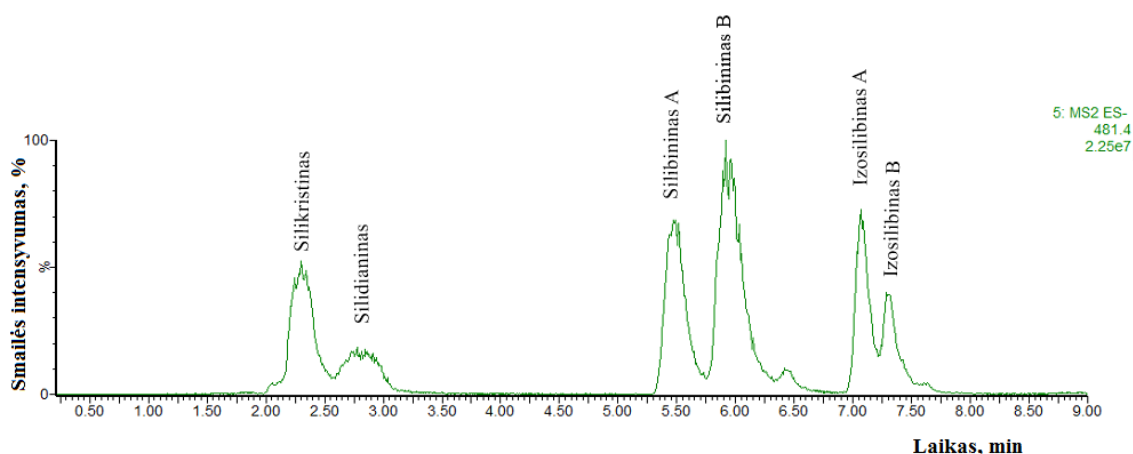
organinės rūgštys. Iš viso tikrųjų margainių vaisių ekstraktuose aptikti 6 pagrindiniai silimarino junginiai.

Atliekant fitopreparatų analizę identifikuoti pagrindiniai flavonolignanų junginiai:

- silibininas A;
- silibininas B;
- silikristinas;
- silidianinas;
- izosilibinas A;
- izosilibinas B.

Visi šie pagrindiniai augalo junginiai identifikuoti lyginant standartinių tirpalų ir tiriamųjų tirpalų (Rt) sulaikymo trukmes.

7 paveiksle pateikta pavyzdinė Lietuvoje išigyto NV1 vaistinio preparato SIR (pasirinkto jono) chromatograma prie m/z 481,4. Nagrinėjant gautą chromatogramą galima identifikuoti pagrindinius silimarino biologiškai aktyvius junginius.



7 pav. Vaistinio preparato NV1 tiriamojo tirpalo bendroji jonų chromatograma

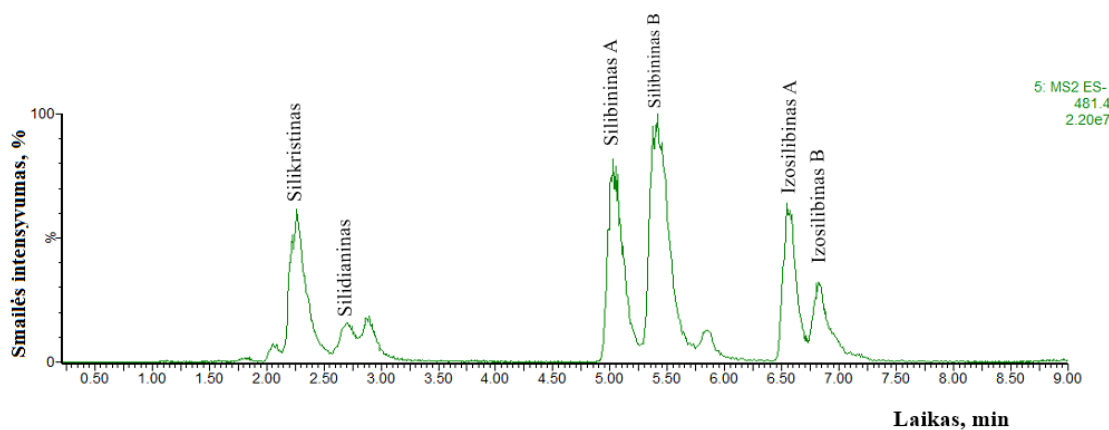
Pirmajame NR1 tiriamajame mėginyje identifikuoti pagrindiniai flavonolignanai, kuriems būdingos sulaikymo trukmės:

- silikristinas – 2,3 min;
- silidianinas – 2,8 min;
- silibininas A – 5,5 min;
- silibininas B – 6,02 min;
- izosilibinas A – 7,07 min;
- izosilibinas B – 7,3 min.

Silimarinas (flavonolignanų frakcija) yra analizuojamas atliekant įvairius farmacinius, fitocheminius ir cheminius bandymus. Silimarinas buvo laikomas grynu junginiu, turinčiu 7-chromanol-3-metil-taksifolino struktūrą, tačiau įdiegus tikslesnius analizės ir atskyrimo metodus buvo nustatyta, kad

galima išskirti ir silibiną, izosilibiną, silidianiną ir silikristiną. Be šių pagrindinių 4 junginių silimarine yra ir keturi diastereomerai (silibininas A, silibininas B, izosilibinas A, izosilibinas B) ir flavonoidas – taksifolinas. Mokslininkų tyrimuose nustatyta, kad silibininas ir izosilibinas yra dviejų diastereomerų mišiniai, turintys tą pačią konfigūraciją C₂ ir C₃ padėtyse [78].

Visuose nagrinėtuose preparatuose identifikuoti pagrindiniai silimarino veiklieji žymenys, todėl pasirinkta palyginti tiriamųjų tirpalų smailių sulaikymo trukmes (Rt) tiriamuosiuose tirpaluose.



8 pav. Vaistinio preparato NV2 tiriamojo tirpalo bendroji jonų chromatograma

8 paveiksle pateikta nereceptinio vaistinio preparato NV2 chromatograma, kurioje matomos smailės junginių, kuriuos jonizuojant neigiamame elektropurkštuvinės jonizacijos režime gaunamas m/z 481 (481,4) fragmentas. Tokių smailių chromatogramoje yra 10, iš jų pagal sulaikymo charakteristikas identifikuotos 6.

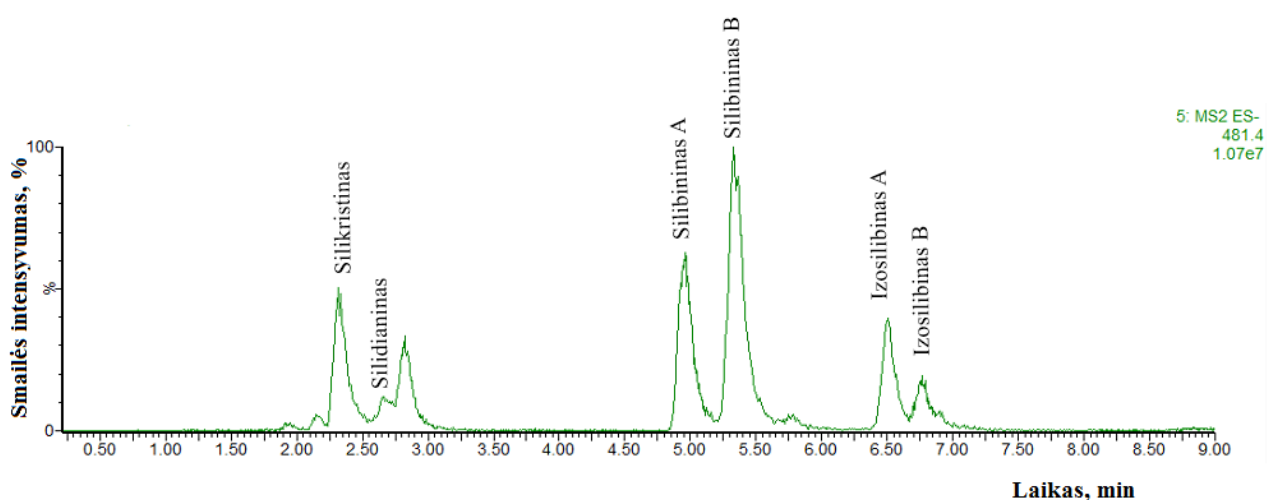
Šiame tiriamajame mėginyje identifikuoti pagrindiniai flavonolignanai, kuriems būdingos tokios sulaikymo trukmės:

- silikristinas – 2,2 min;
- silidianinas – 2,7 min;
- silibininas A – 5,03 min;
- silibininas B – 5,4 min;
- izosilibinas A – 6,5 min;
- izosilibinas B – 6,8 min.

Marginių ekstrakto Europos farmakopėjos monografijose taip pat nurodomi pagrindiniai 6 silimarino komponentai, tačiau vaistinio preparato NV2 chromatogramoje stebimos ir kitos neatpažintos smailės. Neatpažintų smailių spektruose dominuoja tas pats molekulinio fragmento signalas (481), kaip ir kitų identifikuotų smailių. Atsižvelgiant į chromatografinį junginių giminingumą (skirstant tomis pačiomis sąlygomis sulaikymas kolonėlėje skiriasi nežymiai), galima daryti prielaidą, kad tai nėra oksiduotos formos, glikozidinti ar kitaip pakeisti dariniai ar irimo produktai (struktūriniai pakaitai turėtų reikšmingai paveikti chromatografinį sulaikymą). Kadangi šių neidentifikuotų junginių molekulinė masė ta pati, o visi silimarino flavonolignanai turi vienodą molekulinę masę (482,4 Da) [92], jonizuojasi taip pat, tai patvirtina iškeltą prielaidą, kad junginiai yra silimarino kompleksą sudarančių flavonolignanų izomerai, kurie Europos farmakopėjos

monografijose nėra reglamentuojami. Todėl tirto preparato silimarino kompleksas yra platesnis ir skiriasi nuo reglamentuojamo. Pažymėtina, kad analogiškai chromatografiškai atskyrus silimarino komponentus ir siekiant įvertinti kiekybinius rodiklius pagal Europos farmakopėjoje pateiktą kiekybinio skaičiavimo formulę, neidentifikuotos smailės neįsiskaičiuotų ir gautas kiekio rodiklis neatspindėtų suminio visų izomerinių flavonolignanų kiekio.

Analizuojant ir lyginant skirtingų produktų pasirinkto jono masių spektrometrines chromatogramas, galima pažymėti, kad tiek vaistinio preparato NV1, kurio vaistinė forma yra kapsulės, tiek vaistinio preparato NV2, kurio vaistinė forma yra plėvele dengtos tabletės, identifikuoti 6 junginiai, o chromatografinio profilio smailių sulaikymo trukmė buvo panaši. Pažymėtina, kad ir NV2 preparato chromatogramoje yra 10 silimarino frakcijos flavonolignanų žyminčių smailių.



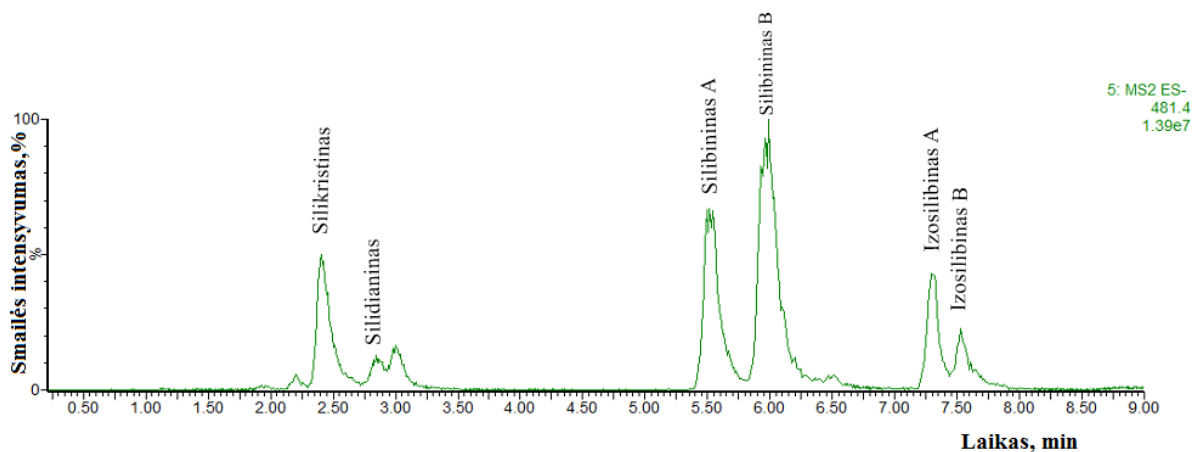
9 pav. Maisto papildu MP4 tiriamojo tirpalo bendroji jonų chromatograma

9 paveiksle pateiktoje chromatogramoje matomi rezultatai, kurie buvo gauti tiriant MP4 maisto papildu mėginį. Šis preparatas yra daugiakomponentis, jo sudėtyje yra ne tik tikrųjų margainių vaisių ekstrakto, tačiau sudėtį papildo ir skaidulinės medžiagos bei tokoferolis. Šiame tiriamajame mėginyje identifikuoti pagrindiniai flavonolignai, kuriems būdingo tokios sulaikymo trukmės:

- silikristinas – 2,3 min;
- silidianinas – 2,8 min;
- silibinas A – 4,9 min;
- silibinas B – 5,3 min;
- izosilibinas A – 6,5 min;
- izosilibinas B – 6,8 min.

Galime pastebėti, kad be pagrindinių 6 silimarino žymenų chromatografiniame profilyje taip pat yra 4 neidentifikuotos smailės. Galima daryti prielaidą, kad analogiškai NV1 preparato mėginiui – tai Europos farmakopėjos monografijoje nenurodyti kiti silimarino flavonolignanų izomerai. Kadangi nenustatyto izomero smailė didesnė nei greta esančio silidianino, tai gali sąlygoti reikšmingas silimarino vertinimo paklaidas tinkamai neatskyrus šių junginių. Pažymėtina, kad nors šio ir kitų neidentifikuotų flavonolignano izomerų kiekis Europos farmakopėjos metodika nevertinamas, tačiau neatrankiu UV spektrofotometriniu būdu jis galėtų būti įvertintas ir įskaičiuotas į bendrą silimarino kiekį.

Pažymėtina, kad nepaisant vaistinės formos (tirti mėginiai buvo kapsulės, dengtos tabletės bei granulės) ir jų gamybai taikytų pagalbinių medžiagų (tarp jų ir polimerinių), silimarino komponentų, sulaikymo trukmė skirstymui naudojant ACQUITY UPLC BEH C18 kolonėlę ženkliai nesiskyrė skirtingai nuo metodologinio vystymo etape vykdytų preliminarių skirstymų efektyviosios skysčių chromatografijos metodu ir taikant Europos direktorato vaistų kokybei duombazėje (<https://www.edqm.eu/en/knowledge-database>) nurodytą kolonėlę (Hypersil ODS C18).

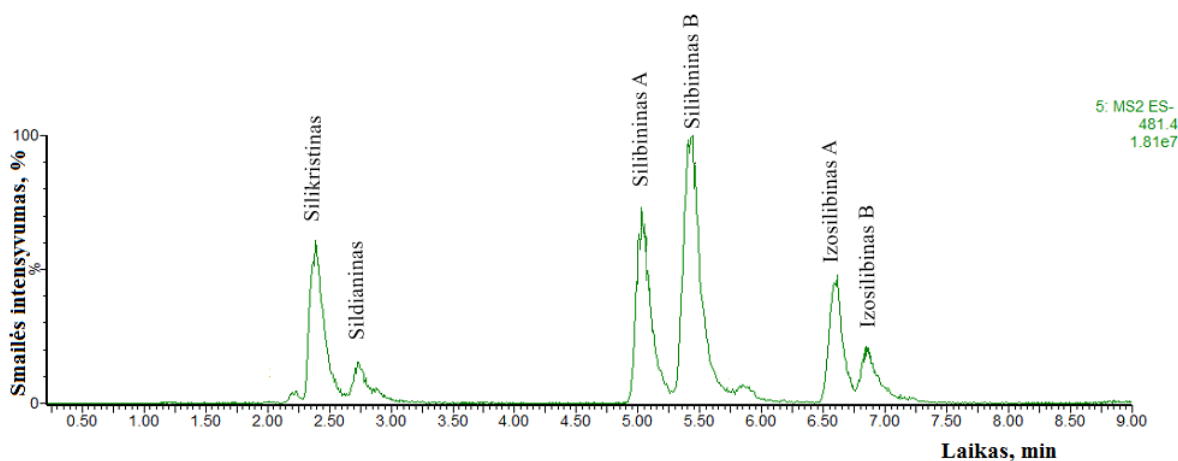


10 pav. Maisto papildu MP3 tiriamojo tirpalo bendroji jonų chromatograma

Maisto papildu MP3 chromatogramoje (žr. 10 pav.) matyti pagrindiniai Europos farmakopėjos monografijoje nurodyti silimarino žymenys ir jų diastereomerai, kurių sulaikymo trukmė:

- silikristinas – 2,2 min;
- silidianinas – 2,8 min;
- silibininas A – 5,5 min;
- silibininas B – 5,9 min;
- izosilibinas A – 7,3 min;
- izosilibinas B – 7,5 min.

Pažymėtina, kad be pagrindinių silimarino žymenų, tiriamojo mėginio bendro jonų srauto (TIC) chromatogramoje aptikta nemažai kitų, neatpažintų medžiagų, kurių sulaikymo trukmė buvo nuo 0,7 min. iki 1,5 min. bei nuo 3,8 min iki 4,3 min. Tikėtina, kad tai – sudėtyje esantys kiti, Europos farmakopėje nenurodyti, tikrųjų margalapių margainių vaisių ekstrakto (nerafinuoto) komponentai, tokie kaip 2,3-dehidrosilidianinas, 2,3-dehidrosilikristinas arba siliamandinas, kuris gali atsirasti kaip silidianino skilimo produktas [91].



11 pav. Maisto papildo MP5 tiriamojo tirpalo bendroji jonų chromatograma

Maisto papildu MP5 nustatyti pagrindiniai silimarino žymenys, kurių sulaikymo trukmės:

- silikristinas – 2,4 min;
- silidianinas – 2,7 min;
- silibininas A – 5,02 min;
- silibininas B – 5,4 min;
- izosilibinas A – 6,6 min;
- izosilibinas B – 6,8 min.

Apibendrinant galima pažymėti, kad visuose nagrinėtuose skirtinguose fitopreparatuose (UESCh – MS) metodu identifikuoti visi pagrindiniai silimarino žymenys: silikristinas, silidianinas, silibininas A, silibininas B, izosilibinas A, izosilibinas B. Pažymėtina, kad maisto papilduose, nepaisant šių preparatų priskyrimo kitai produktų grupei, kuriai numatytas neterapinio pobūdžio taikymas ir skirtingi norminiai reikalavimai, nepaisant dalies maisto papildų daugiakomponentiškumo, taip pat identifikuoti visi silimarino biologiškai aktyvūs komponentai. 7 lentelėje galima matyti visų 10 komercinių fitopreparatų sulaikymo trukmių (R_t) vidurkius.

7 lentelė. Fitopreparatų sulaikymo trukmių (R_t) vidurkiai

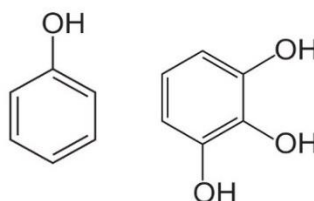
Tiriamasis junginys	R_t vidurkis
silikristinas	2,3 min.
silidianinas	2,8 min.
silibininas A	5,2 min.
silibininas A	5,6 min.
izosilibinas B	6,8 min.
izosilibinas A	7,04 min.

3.1.2. Kitų fenolinių junginių ir jų rūgščių kokybinis nustatymas ultra efektyviosios skysčių chromatografijos tandeminės – masių spektrometrijos (UESCh – MS) metodu

Natūralūs polifenoliai yra didelė augalų antrinių metabolitų grupė, nuo mažų molekulių iki labai polimerizuotų junginių. Šie antriniai metabolizmo produktai natūraliai išsiskiria skirtingomis augalų augimo fazėmis [79]. Remiantis cheminėmis struktūromis, natūralūs fenoliniai junginiai gali būti

chemiškai suskirstyti į keletą klasių, įskaitant flavonoidus, fenolio rūgštis, lignanus, stilbenus ir kt. Galima išskirti, kad flavonoidai ir fenolio rūgštys sudaro atininkamai 60 proc. ir 30 proc. visų natūralių polifenolių. Jie plačiai paplitę gamtoje, ir sutinkami ypač dideliais kiekiais daugelyje maisto produktų ir augalų vaisių.

Fenoliniai junginiai savo cheminėje struktūroje (žr. 12 pav.) turi aromatinį žiedą, prie kurio prijungtos viena arba kelios hidroksilo grupės [80].



12 pav. Fenolinių junginių pavyzdžiai

Pažymėtina, kad augaluose esantys fenoliai ir fenolinės rūgštys pasižymi antioksidacinėmis, uždegimą slopinančiomis, antivirusinėmis savybėmis, antialerginėmis ir kraujagysles plečiančiomis savybėmis, todėl jų identifikavimas svarbus įvairiuose fitopreparatuose. Šių junginių antioksidacinį poveikį stiprinantis veiksnys yra hidroksilo grupių skaičius bei jo išsidėstymas struktūroje (aromatiniame žiede) [81]. Fenoliniai junginiai paprastai neturi tiesioginio hepatoprotekcinio poveikio kepenims, tačiau tikrųjų margainių vaisių cheminėje sudėtyje dominuoja ankščiau nagrinėti flavonolignanai, fitosteroliai, tokoferoliai, aminai, baltymai, užtikrina kepenų ląstelių antioksidacinę apsaugą, lėtina lipidų peroksidaciją, skatina fermento polimerozės sintezę kartu užtikrina kepenų ląstelių regeneravimąsi [82]. Pirmasis junginys, kurį išskyrė XIX a. mokslininkas Ševrole buvo kvercetas. Flavonoidai negali būti sintetinami žmonių ar gyvūnų, todėl vaistų pramonėje jų yra didžiulė gausa pardavinėjamų maisto papildų ar vaistinių preparatų pavidalu [83].

Silimarinas tirtas daugybėje *in vitro* ir *in vivo* tyrimų įvairiam biologiniam aktyvumui nustatyti. Svarbu, kad dauguma ekstraktų gamintojų apibūdina savo produktus tik procentiniu silimarino kiekiu, nepaisydami visų kitų komponentų. Kai kurie mokslininkai, skelbdami tyrimo rezultatus deja nenustato tikslios medžiagos su kuria dirba, sudėties. Tuomet kyla rimtų problemų dėl rezultatų pagrįstumo, nes silimarino sudėtis skiriasi priklausomai nuo technologinio žaliavų perdirbimo, naudojamo augalo fitocheminės sudėties įvairovės bei klimato sąlygų augimo metu.

Kitų fenolinių junginių ir jų rūgščių kokybinis nustatymas ultra efektyviosios skysčių chromatografijos tandeminės – masių spektrometrijos metodu atrinkti 4 fitopreparatai – NV1, NV2, MP3, MP5. Šio tyrimo metu identifikuoti fenoliniai junginiai, padėsiantys įvertinti komercinių produktų fitocheminės sudėties kompleksiskumą. Remiantis *ChemSpider* duomenų baze ir literatūros duomenimis visi aptikti fenoliniai junginiai buvo identifikuoti kaip margalapių margainių žaliavoms būdingi biologiškai aktyvūs junginiai.

NV1 tiriamajame mėginyje identifikuoti fenoliniai junginiai, kuriems būdingos tokios sulaikymo trukmės nurodytos žemiau pateiktoje lentelėje (žr. 8 lentelė)

8 lentelė. NV1 vaistiniame preparate m/z jonui [M-H]⁻ specifikoje chromatogramose identifikuotos smailės lyginant su etalonu

Smailės Nr.	Junginys	Formulė [M-H] ⁻	Sulaikymo trukmė, min	MS [M-H] ⁻ , m/z
(1)	Chino rūgštis	C ₇ H ₁₂ O ₆	0,7	191,17
(2)	3,4-dihidroksibenzoinė rūgštis	C ₇ H ₆ O ₄	1,9	153,12
(3)	Ferulo rūgštis	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	5,4	193,18
(4)	Dikafeoilchino rūgštis	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	5,4	515,4
(5)	Kemferol-3-O-gliukozidas	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	6,1	447,4
(6)	Apigenino-7-gliukozidas	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	6,2	431,4
(7)	Eriodiktiolis	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	6,6	287,25
(8)	Kvercetino dariniai	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₃	6,6–6,9	301,23
(9)	Kampferolis	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	7,7	285,24
(10)	Pinocebrinas	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	8,0	255,25
(11)	Chrizinas	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	8,6	253,24

Chromatografiškai skirstant NV1 tiriamojo mėginio tirpalą eliuojami komponentai pasiskirstė pagal jų fizikochemines savybes. Pradžioje pavyko atskirti vandenyje tirpius junginius, kurie identifikuoti kaip chino rūgštis ir 3,4-dihidroksibenzoinė rūgštis. Hidrofiliscesni už silimariną amfifiliniai junginiai, kurie tirpsta ir vandenyje ir etanolyje, turėtų būti ilgiau sulaikomi kolonėlėje ir aptikti chromatogramoje prieš silimarino komponentus, tačiau pastebėta, kad tokių NV1 tiriamajame mėginyje nėra. Iš analizės metu gautų duomenų galima matyti, kad greta silimarino preparato sudėtyje yra ne vienas junginys, kuris yra naudingas žmogaus sveikatai. Pavyzdžiui, pinocebrinas (5,7-dihidroksiflavanonas) yra vienas iš pagrindinių flavonoidų išskiriamų augalų. Platus jo farmakologinių savybių spektras gerai iširtas, įskaitant antimikrobinį, uždegimą slopinantį, antioksidacinį ir priešvėžinį poveikius [84]. Tarp kitų junginių išskirtas flavonolis – kvercetas. Šiam junginiui būdingos uždegimą slopinančios, antiproliferacinės savybės. Taip pat pasižymi antialerginiu, antivirusiniu, priešvėžiniu poveikiu. Buvo įrodyta, kad kvercetas atlieka apsauginę funkciją sergant kepenų ligomis [85].

Šiame NV2 tiriamajame mėginyje identifikuoti fenoliniai junginiai, kuriems būdingi tokie sulaikymo laikai nurodyti žemiau pateiktoje lentelėje (žr. 9 lentelė)

9 lentelė. NV2 vaistiniame preparate m/z jonui [M-H]⁻ specifikoje chromatogramose identifikuotos smailės lyginant su etalonu

Smailės Nr.	Junginys	Formulė [M-H] ⁻	Sulaikymo trukmė, min	MS [M-H] ⁻ , m/z
(1)	Chino rūgštis	C ₇ H ₁₂ O ₆	0,6	191,17
(2)	Dikafeoilchino rūgštys	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	5,2–5,4–6	515,4
(3)	Kvercetin-7-gliukozidas	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	5,3–5,5	463,4
(4)	Taksifolinas	C ₁₅ H ₁₂ O ₇	5,8	303,25
(5)	Kemferol-3-O-gliukozidas	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	6,1	447,4

9 lentelės tęsinys. NV2 vaistiniame preparate m/z jonui [M-H]⁻ specifinėse chromatogramose identifikuotos smailės lyginant su etalonu

Smalės Nr.	Junginys	Formulė [M-H] ⁻	Sulaikymo trukmė, min	MS [M-H] ⁻ , m/z
(6)	Apigenino-7-gliukozidas	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	6,1	431,4
(7)	Eriodiktiolis	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	6,5	287,25
(8)	Kvercetino dariniai	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₃	6,5–6,8–7	301,23
(9)	Kemferolis	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	7,3	285,24
(10)	Pinocembrinas	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	8,07–8,2	255,25
(11)	Chrizinai	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	8,5	253,24

Fenolinės rūgšys, kaip kavos, kumaro ar ferulo rūgštys, kaupiamos daugumos augalų. Šių rūgščių koncentracija priklauso nuo augalo brendimo stadijos ir dėl auginimo sąlygų. Atskirose augalo dalyse fenolinių rūgščių kiekis skiriasi, lyginant lapus ir vaisius, augalo vaisiuose galima rasti daugiau fenolinių rūgščių [86].

Lyginat vaistinio preparato NV1 ir NV2 chromatogramas galima matyti, kad analizės metu identifikuoti junginiai skyrėsi. Kai kurių junginių smailės yra persidengusios, tikėtina, kad yra daug priemaišų ir junginius sunku identifikuoti. Galima paminėti, kad NV1 chromatogramoje neidentifikuotas taksifolinas ir kvercetin-7-gliukozidas, o NV2 šie žymenys identifikuoti. Taksifolinas yra vienas iš pagrindinių silimariniui būdingų biologiškai aktyvių junginių, jis priklauso bioflavonoidams ir yra natūralios kilmės etaloninis antioksidantas, galima daryti prielaidą, kad jo nebuvimas NV1 vaistiniame preparate rodo, kad yra pritaikytas ekstrakcijos būdas, kuris flavonoidų atsisako. Šio žymens fitopreparate nėra tai galima įvardinti, kad gamyboje yra pritaikytos ypatingos technologijos, kurios nežinoma ar neturi įtakos bendram sisteminiam poveikiui, tačiau silimarino poveikis kepenims terapiškai aktyvus ir jis siejamas tik išimtinai su flavonglignanais, todėl jam tai įtakos neturi. Tai, kad NV2 preparate identifikuotas taksifolino žymuo, gali duoti papildomą farmakologinį poveikį žmogaus organizmui, pavyzdžiui antioksidacinį, taip pat manoma, kad taksifolinas pasižymi priešnavikiniu aktyvumu [87,93].

Maisto papildo MP3 tiriamajame mėginyje identifikuoti fenoliniai junginiai, kuriems būdingi sulaikymo laikai nurodyti žemiau pateiktoje lentelėje (žr. 10 lentelė)

10 lentelė. MP3 maisto papilde m/z jonui [M-H]⁻ specifinėse chromatogramose identifikuotos smailės lyginant su etalonu

Smalės Nr.	Junginys	Formulė [M-H] ⁻	Sulaikymo trukmė, min	MS [M-H] ⁻ , m/z
(1)	Chino rūgšties dariniai	C ₇ H ₁₂ O ₆	0,53–0,67–0,91	191,17
(2)	Sinapo rūgštis	C ₁₁ H ₁₂ O ₅	5,3	223,21
(3)	Taksifolinas	C ₁₅ H ₁₂ O ₇	5,7	303,25
(4)	Apigenino-7-gliukozidas	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	6,1	431,4
(5)	Eriodiktiolis	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	6,46–6,51	287,25
(6)	Kvercetas	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₃	6,31–6,90	301,23

10 lentelės tęsinys. MP3 maisto papilde m/z jonui [M-H]⁻ specifikoje chromatogramose identifikuotos smailės lyginant su etalonu

Smailės Nr.	Junginys	Formulė [M-H] ⁻	Sulaikymo trukmė, min	MS [M-H] ⁻ , m/z
(7)	Pinocebrinas	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	7,32	255,25
(8)	Chrizinas	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	8,54	253,24

Identifikuotų junginių skaičius lyginant maisto papilde MP3 ir vaistiniuose preparatuose NV1 bei NV2 yra mažesnis ir junginiai šiek tiek skiriasi. Nustatyta, kad šiame maisto papilde neidentifikuoti 3,4-dihidroksibenzoinė rūgštis, ferulo rūgštis, cinarinas, kemferolis ir jo gliukozidas – kemferol-3-gliukozidas. Maisto papilde taip pat identifikuota hidroksicinamoninė rūgštis – sinapo rūgštis ir flavanonolis – taksifolinas, kuris vienas iš pagrindinių margalapių margainių polifenolinių junginių.

Maisto papildu MP5 tiriamajame mėginyje identifikuoti fenoliniai junginiai, kuriems būdingi sulaikymo laikai pateikti 11 lentelėje.

11 lentelė. MP5 maisto papilde m/z jonui [M-H]⁻ specifikoje chromatogramose identifikuotos smailės lyginant su etalonu

Smailės Nr.	Junginys	Formulė [M-H] ⁻	Sulaikymo trukmė, min	MS [M-H] ⁻ , m/z
(1)	Chino rūgšties dariniai	C ₇ H ₁₂ O ₆	0,7	191,17
(2)	3,4-dihidroksibenzoinė rūgštis	C ₇ H ₆ O ₄	1,7	153,12
(3)	Chlorogeno rūgštis	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	3,5	353,31
(4)	Kavos rūgšties dariniai	C ₉ H ₈ O ₄	3,7–4,0	179,16
(5)	Kemferol-3-O-glukuronidas	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	5,70	461,4
(6)	Taksifolinas	C ₁₅ H ₁₂ O ₇	5,86	303,25
(7)	Kemferol-3-O-gliukozidas	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	6,1	447,4
(8)	Florizinas	C ₂₁ H ₂₄ O ₁₀	6,09	435,4
(9)	Eriodiktolis	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	6,6	287,25
(10)	Miricetinas	C ₁₅ H ₁₀ O ₈	6,6–6,8	317,23
(11)	Kvercetas	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₃	6,8–7,0	301,23
(12)	Izoramnetinas	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	7,36	315,26
(13)	Pinocebrinas	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	8,02	255,25

Lyginant su prieš tai buvusiais fitopreparatais didžioji dalis fenolinių junginių identifikuoti panašūs, pabrėžtina, kad MP5 yra daugiakomponentis preparatas, turintis savo sudėtyje daugiau komponentų, ne tik silimariną, bet ir kurkuminą, vaistinių medetkų, didžiųjų dilgelių ekstraktų ruošinius ir kt., todėl identifikuoti junginiai galėjo patekti į produktą iš įvairių ingredientų. Šiame preparate, lyginant su kitais, identifikuota chlorogeno rūgštis, kavos rūgštis, kemferol-3-O-glukuronidas, kemferol-3-gliukozidas, florizinas, miricetinas, kai tuo tarpu kituose fitopreparatuose šie junginiai neidentifikuoti. Taip pat galima paminėti, kad šiame mėginyje neidentifikuotas chrizinas. Galima daryti prielaidą, kad identifikuotų junginių profilis ženkliai skiriasi nuo prieš tai nagrinėtų fitopreparatų dėl maisto papildu daugiakomponentiškumo.

Apibendrinant (UESCh – MS) metodu gautus preparatų turinio analizės rezultatus, galima teigti, jog visuose Lietuvos vaistinių asortimento komerciniuose fitopreparatuose aptikti pagrindiniai fenoliniai junginiai, taip pat organinės ir fenolinės rūgštys, būdingi margalapių margainių žaliavoms. Svarbu pabrėžti, kad preparatuose aptikti ne tik silimarino žymenys, kaip antai: silibinas, silikristinas, silidianinas ir izosilibinas, bet ir kiti fenoliniai junginiai, kaip antai: kvercetas, taksifolinas, ferulo rūgštis ir kt. Visuose pasirinktuose fitopreparatuose identifikuota chino rūgštis, kvercetas, pinocembrinas. Identifikuoti junginiai taip pat naudingi žmogaus sveikatai ir daugelis jų pasižymi antioksidacinėmis, uždegimą slopinančiomis savybėmis.

3.2. Kiekybinis silimarino nustatymas efektyviosios skysčių chromatografijos (ESCh) metodu

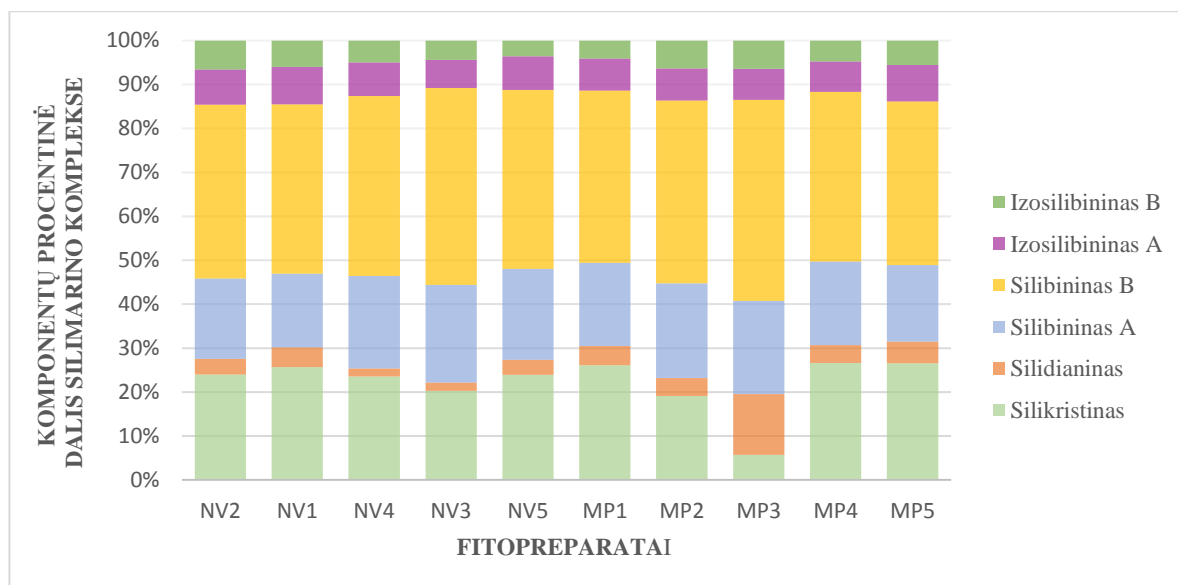
Atliekant kiekybinę tikrojo margainių vaisių fitopreparatų analizę, siekta nustatyti silimarino ir jo komponentų koncentracijas nagrinėtuose preparatuose farmakopėjiniu metodu. Šiuo analizės metodu nepavyko pasiekti tinkamų analitinių chromatografinio skirstymo rodiklių. Chromatogramų pagrindinių smaيليų sulaikymo trukmės atkuriamumas neatitiko numatytų ribų (ne daugiau 5 procentų), o kitos skirstymo charakteristikos (skiriamoji geba ir simetriškumas) taip pat buvo pripažintos kaip nepakankamos. Tikėtina, kad analitinių skirstymo rodiklių blogėjimas iš dalies gali būti siejamas su papildomų junginių, esančių kompleksiniuose fitopreparatuose, buvimu. Taip pat analitės prigimtis gali įtakoti analizės netinkamumą, pavyzdžiui, blogas silimarino komponentų tirpumas pradinėse judrios fazės gradiento frakcijose, kas galėjo lemti netinkamų konglomeratų formavimąsi chromatografinėje sistemoje ir analitinėje kolonėlėje.

3.3. Kiekybinis silimarino nustatymas ultra efektyviosios skysčių chromatografijos (UESCh) metodu

Atliekant kiekybinę tikrųjų margainių vaisių fitopreparatų analizę, buvo siekiama nustatyti silimarino ir jo komponentų koncentraciją nagrinėtuose preparatuose ir taip palyginti gautus rezultatus su gamintojo pateikiamais duomenimis ant pakuotės ir palyginti bendrą flavonolignanų mišinio profilį. Remiantis Europos farmakopėjos monografijų rekomendacijomis, silimarino fitopreparatai kiekybiškai vertinami ultra efektyviosios skysčių chromatografijos metodu. Europos farmakopėjos kiekybinis įvertinimas atliekamas pagal bendrą silimarino kiekį (išreikštą silibininu) bei sudedamųjų komponentų silikristino ir silidianino, silibinino A ir silibinino B, izosilibinino A ir izosilibinino B koncentracijų sumą. Europos vaistų agentūros gairėse standartizuotų augalinių preparatų specifikacijai kaip ir Europos farmakopėje nurodyta, kad silimarino kiekis tiriamajame preparate privalo patekti į 95–105 proc. ribą nuo ženklinime nurodyto kiekio [11]. Analitiškai reikšmingas su silimarino veikliąja medžiaga gaminamų fitopreparatų iššūkis yra blogas flavonolignanų tirpumas vandenyje, dėl to bendras aptinkamo silimarino kiekis gali neatitikti Europos farmakopėjos nustatytų ribų. Tačiau blogas silimarino tirpumas vandenyje labai svarbus ir jo bioasimiliacijai. Todėl preparatai, kuriuose panaudoti nefunkcionalizuoti blogai tirpūs silimarino ruošiniai, kartu yra menkos farmacinės ar mitybinės vertės.

Silimarino procentinis kiekis turi atitikti silibinino A ir silibinino B, izosilibino A ir izosilibino B, silikristino ir silidianino veikliųjų dalių sumą, apskaičiuotą atžvelgiant į bendrą silimarino kiekį. Atitinkamai silimarino procentinė dalis turi sudaryti ne mažiau kaip 30 proc. ir ne daugiau kaip 65 proc., silikristino ir silidianino 20–45 proc., silibinino A ir silibinino B 40–65 proc., izosilibino A ir izosilibino B 10–20 proc., viso silimarino kiekio.

Atlikus chromatografinių duomenų programinį apdorojimą buvo nustatytos kiekviename fitopreparatų tirpaluose esančių silimarino aktyviųjų komponentų chromatogramų smailių plotų reikšmės (AUC) pagal Europos farmakopėjos monografijos metodologiją. Farmakopėje nurodytų kokybės rodiklių – 3 silimarino frakcijų komponentų smailių plotų sumų procentinės dalies pasiskirstymas pateiktas 12 lentelėje. Analizės metu gautų duomenų rezultatai rodo atskirų flavonoidų/flavonolignanų komponentų chromatografinio profilių skirtumus. Iš gautų duomenų matyti, kad silibinino A ir B suma svyravo nuo 54,69 proc. iki 67,06 proc., silikristino ir silidianino suma svyravo nuo 22,17 proc. iki 31,48 proc., izosilibinino A ir izosilibinino B suma svyravo nuo 10,68 proc. iki 14,8 proc., kai visų flavonoidų/flavonolignanų smailių plotų suma buvo prilyginta 100 proc.



13 pav. Silimarino komponentų procentinė dalis bendrame komplekse, nustatyta pagal komponentų smailių plotų dydžius.

Atlikus kiekybinę standartizuotų ekstraktų analizę rezultatai parodė, kad sudedamųjų komponentų: silikristino ir silidianino, silibinino A ir silibinino B, izosilibinino A ir izosilibinino B koncentracijų suma, priklausomai nuo gamintojo skiriasi. Palyginimui pateikta 10 skirtingų gamintojų standartizuotų ekstraktų tyrimo rezultatai (žr. 13 pav.). Žinoma, kad atskirų komponentų koncentracija labai priklauso tiek nuo augalinės žaliavos, tiek nuo technologinių veiksnių. Tyrimo rezultatai parodė, kad pagrindinių 6 komponentų kiekis ekstraktuose skiriasi.

12 lentelė. Silimarino sudėties kokybiniai rodikliai, apskaičiuoti remiantis Europos farmakopėjos metodika. I – NV1; II – NV2; III – NV3; IV – NV4; V – NV5; VI – MP1; VII – MP2; VIII – MP3; IX – MP4; X – MP5.

	Ribos (proc.)	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
silikristinas + sidianinas (%)	20–45	30,18	27,53	22,17	25,37	26,83	29,30	23,23	28,21	16,82	31,48
silibininas A + silibininas B (%)	40–65	55,29	57,86	67,06	61,99	60,18	55,89	63,16	59,78	30,67	54,69
izosilibininas A + izosilibininas B (%)	10–20	14,52	14,60	10,67	12,64	12,96	14,80	13,60	12,00	57,67	13,83

Lyginant silibininą A ir silibininą B – pagrindinius silimarino flavonolignanų fitopreparatuose, iš gautų rezultatų galima nustatyti, kad didžiausia silibinino A ir silibinino B sumos procentinė dalis bendrame flavonolignanų komplekse buvo nustatyta daugiakomponenčiame maisto papildo MP5 mėginyje (žr. 13 pav.), mažiausia ir didžiausia vertė buvo atitinkamai 54,68 proc. ir 67,06 proc.

Atsižvelgiant į analizės metu gautus rezultatus, galima daryti išvadas apie fitopreparatų sudėties įvairumą remiantis Europos farmakopėjos reglamentuojama metodika. Lyginant fitopreparatų bendrą profilį galima teigti, kad yra individualių produktų sudėties skirtumų. Remiantis Europos farmakopėjos metodika, atlikta ESC technika NV3 vaistinio preparato silibinino A + silibinino B koncentracija nepatenka į Europos farmakopėjos monografijos reglamentuojamas 40–65 proc. ribas. Iš gautų duomenų matyti, kad silibinino A ir B suma viršija Europos farmakopėje nustatytas leistinas ribas (nustatyta silibinino A + silibinino B suma 67,06 proc). Galima teigti, kad viena iš galimų priežasčių, kodėl gauti NV3 vaistinio preparato rezultatai neatitinka Europos farmakopėje nurodytų ribų yra vaistinio preparato kompleksiskumas, dėl kurio gauta chromatograma gali būti netiksli, galimi smailių persidengimai chromatogramose ir dėl to sunku tiksliai įvertinti konkrečius junginius. Dar viena iš priežasčių, blogas flavonolignanų tirpumas poliniuose tirpikliuose, pvz.: vandenyje. Pabrėžtina, kad yra bandymų norint pagerinti biologinį prieinamumą, sukuriant mikrosferų, nanoemulsijų, nanokristalų ir mikroemulsijų sistemas ir kt. [76].

Remiantis ultra efektyviosios skysčių chromatografijos duomenimis, nustatytas silimarino kiekis tirtuose fitopreparatuose, duomenys pateikti 13 lentelėje.

13 lentelė. Tirtų komercinių fitopreparatų nustatytas silimarino kiekis Europos farmakopėjos reglamentuojama metodika

Preparatas	Ženklime nurodytas preparato tipas	Ženklime nurodytas silimarino kiekis dozuotės vienetė (mg)	Nustatytas silimarino kiekis dozuotės vienetė (mg)	Nustatytas silimarino atgavimas dozuotės vienetė (proc.)	Taikytinos ribos (proc.)
NV1	Vaistinis preparatas	110	105,86	96,24	90–110
NV2	Vaistinis preparatas	22,5	10,29	45,74	90–110
NV3	Vaistinis preparatas	140	142,51	101,79	90–110
NV4	Vaistinis preparatas	150	140,56	93,71	90–110
NV5	Vaistinis preparatas	75	41,42	59,17	90–110
MP3	Maisto papildas	45	5,69	12,65	85–115
MP2	Maisto papildas	22,5	23,16	102,92	85–115
MP1	Maisto papildas	150	18,29	12,20	85–115
MP5	Maisto papildas	90	77,16	85,73	85–115
MP4	Maisto papildas	105	24,39	23,23	85–115

Naudojantis parinkta metodika, nustatyta, kad dalies produktų tyrimo metu gauti rezultatai daugiau nei 5 proc. nukrypsta nuo deklaruojamo produkto stiprumo. 6 iš 10 pasirinktų nagrinėti komercinių fitopreparatų rezultatų nuokrypis viršija 10 proc. Nuokrypio reikšmingumo vertinimui pasirinktos skirtingos ribos produktų grupėms. Kadangi vaistiniuose preparatuose margalapių margainių ekstraktą galima naudoti tik standartizuotą, tai produkto kiekybės rodikliai neturėtų nukrypti daugiau

kaip 10 proc. (5 proc. technologinės kilmės variacija ir 5 proc. – stabilumo variacijos diapozonos). Maisto papildams pasirinktas variacijos diapozonas ± 15 proc. Didžiausias silimarino nuokrypis nustatytas maisto papildų MP1, MP3, MP4 tiriamuosiuose mėginiuose, kur nustatyta silimarino atgavimo koncentracija siekė atitinkamai MP1 – 12,20 proc. (82,8 proc. sumažėjimas nuo minimalios numatytos ribos), MP3 – 12,65 proc. (82,35 proc. sumažėjimas nuo minimalios ribos), MP4 nustatyta koncentracija analizės metu – 23,23 proc. (71,77 proc. sumažėjimas nuo minimalios ribos). Pažymėtina, kad MP1 ženklime pateikta silimarino ekstrakto sudėties informacija neatitinka vaistiniams preparatams taikomų normų (30–65 proc.).

MP2 maisto papilde nustatytas nereikšmingai didesnis silimarino atgavimo procentas. Svarbu pažymėti, kad maisto papildų gamintojai kartais taiko perviršius, kas be farmakologinio pagrindo neleistina gaminant vaistinius preparatus, siekdami užtikrinti ženklime nurodytą komponento kiekį, tačiau tvarka dėl augalinių ingredientų perviršių nėra reglamentuota, bet kokiu atveju, jei perviršiai būtų taikomi, gamintojas turėtų informuoti vartotoją apie perviršius [89,90].

Galima pastebėti, kad reikšmingas (didesnis nei 5 proc.) nuokrypis nuo ženklime pateikto kiekio nustatytas ne tik maisto papildų, bet ir dalies nereceptinių vaistinių fitopreparatų. Didžiausią nuokrypį vertinant nereceptinius vaistinius preparatus galima pastebėti NV5, šio vaistinio preparato atgavimo koncentracija siekė 59,17 proc. (35,83 proc. sumažėjimas nuo minimalios leistinos ribos). NV1 – 69,74 proc. (25,26 proc. sumažėjimas nuo minimalios leistinos ribos), NV2 – 45,74 proc. (49,26 proc. sumažėjimas nuo minimalios leistinos ribos). Taikytos metodikos metu mažiausi nukrypimai nuo leistinų ribų buvo vaistinio preparato NV1, kurio atgavimo koncentracija nustatyta – 96,24 proc., kitas – nereceptinis vaistinis preparatas NV3, kurio koncentracija nustatyta – 101,79 proc. bei nereceptinis vaistinis preparatas NV4, kurio koncentracija nustatyta – 93,71. Taikytinos metodikos metu mažiausi nukrypimai nuo leistinų ribų nustatyti ir dviejuose iš maisto papildų. MP2 koncentracija nustatyta – 102,92 proc., MP5 – 85,73, pabrėžtina, kad tai daugiakomponentis preparatas. Rezultatų vertinimą komplikuoja tai, kad nors pritaikytos ultra efektyviosios skysčių chromatografijos eliucinės sąlygos buvo modifikuotos atsižvelgiant į nurodytas Europos farmakopėjoje (eliuento komponentai, atvirkštinių fazių sorbento rūšis), tačiau preanalitinės kiekvieno iš tirtų produktų savybės gali ženkliai skirtis priklausomai nuo ruošinio formos ir kitų ingredientų įtakos. Kadangi produkto mėginio kompleksiskumas galėjo padaryti poveikį turinio analizei ir nustatytam rodikliui, rezultatai nėra vertintini kaip galutiniai, o kaip fitocheminės variacijos diapozono rodmenys.

Skelbti kitų mokslininkų tyrimų rezultatai patvirtina, kad fitocheminė variacija yra būdinga silimarino produktams. Čekų mokslininkai atliko tyrimą, kurio metu nagrinėti skirtingi silimarino preparatai iš Čekijos ir JAV. Jie susidūrė su problema – bloga chemine ir mikrobiologine kokybe, nagrinėjant skirtingus rinkoje esančius margalapių margainių preparatus. Todėl šio tyrimo tikslas buvo ištirti 26 silimarino preparatų cheminę ir biologinę sudėtį JAV ir Čekijos rinkose nuo 2016 iki 2017 m. Tyrimas buvo orientuotas į sudėties, veikliųjų komponentų nustatymą, taip pat galimus teršalus bei mikrobiologinį grynumą. Analizė buvo atliekama naudojant pažangias UESCh – MS metodikas [88]. Tokiu būdu aptikti silimarino kiekio skirtumai tarp mėginių ir gamintojų pateiktos informacijos ant pakuotės.

Analizės metu gautų duomenų rezultatai parodė didelius atskirų flavonoidų/flavonolignanų kiekio skirtumus, net skirtingose tų pačių gamintojų partijose. Tai galima matyti lyginant silibinino A ir silibinino B – pagrindinių silimarino flavonolignanų fitopreparatuose rodikliu. Iš gautų duomenų

pastebima, kad silibino A ir B procentinė dalis svyravo nuo 36 proc. iki 66 proc., kai visų flavonoidų/flavonolignanų buvo laikoma 100 proc. Didžiausia variacija skirtingose to paties gamintojo partijose buvo mokslininkų vertinto Nr. 6 užkoduoto produkto, kurio, mažiausia ir didžiausia vertė buvo atitinkamai 44 proc. ir 62 proc. [88]

Kito tyrimo metu, kurį atliko mokslininkai iš Sietlo, Vašingtono universiteto, siekiant nustatyti 6 pagrindinius silimarino biologiškai aktyvius komponentus, sukurta ir optimizuota validuota UESCh – MS/MS metodika. Tyrimui buvo pasirinkti 5 JAV rinkoje esantys silimarino fitopreparatai. Analizės metu mokslininkams pavyko nustatyti visus 6 flavonolignanų mišinio komponentus, tačiau žymėtina tai, kad visuose fitopreparatuose jų koncentracija skyrėsi nuo ženklime deklaruotos gamintojo informacijos. Iš gautų tyrimo duomenų galima daryti išvadą, kad sukurta ir validuota UESC – MS/MS metodika tinka silimarino fitopreparatų analizei [77].

Augalinių maisto papildų vartojimas dėl jų pristatomos naudos sveikatai, nepaisant jų dažnai neįrodyto veiksmingumo, stabiliai didėja [88]. Pagrindinė daugelio augalinių maisto papildų kaip ir kitų vaistams panašių produktų vartojimo problema yra veiksmingumo bei standartizacijos stoka augalinių maisto papildų kūrimo ir kokybės užtikrinimo procese. Silimarino preparatų sudėčiai įtakos gali turėti daugybė veiksnių, įskaitant agrokultūrinius ir įvairaus lygio technologinius veiksnius, o tai neabejotinai gali lemti didelį silimarino komplekso kompozicijų kintamumą. Kritinei kontrolei svarbūs veiksniai apima: naudojamų augalų taksonominę ir genetinę įvairovę, klimato sąlygas, sezonines ir geografines sąlygas ir (arba) silimarino flavonoidų/flavonolignanų ekstrahavimo metodus. Geros gamybos praktikos palaikymas taip pat yra labai svarbus, tačiau dažnai pažeidžiamas šių nereceptinių preparatų gamyboje. Apibendrinant, gauti rezultatai rodo, kad būtina griežtai kontroliuoti preparatų sudėtį ir kokybę tiek produkto išleidimo į rinką, tiek technologinio apdorojimo, tiek pradinėse eksperimentinės plėtos stadijose.

Atlikto tyrimo duomenis patvirtina ir mokslininkų tyrimai. Per pastaruosius metus buvo atlikti tyrimai, kurie skirti cheminiams silimarino produktų apibūdinimams. Li ir kt. [77] sukūrė 40 minučių ESCh – MS metodą silibinino analizei plazmoje. Hadad ir kt. [11] sukūrė 8 minučių HPLC metodą (naudojant monolitines kolonėles) septynių junginių iš silimarino analizei. Junginiai buvo aptikti remiantis jų absorbcija 288 nm bangos ilgiui. Wang ir kt. tyrimo metu, septynių junginių iš silimarino identifikavimui naudojamas ultra efektyviosios skysčių chromatografijos metodas, sujungtas su elektroninio purškimo jonizacijos masės spektrometrija. Pagrindinis šio metodo pranašumas yra greitas analizės laikas, šiuo atveju – 6 min. Šis metodas pirmasis patvirtintas visų aštuonių pagrindinių silimarino bioaktyvių komponentų kiekybinės analizės metodas [11].

Taigi apibendrinant galima teigti, kad kiekybinė UESCh – MS analizė leidžia nustatyti *Silybum marianum* L. fitopreparatų sudėtį bei bendrą profilį. Taip pat įvairūs mokslininkų tyrimai įrodo, kad yra sukurtas ir validuotas ne vienas metodas, kuris leidžia identifikuoti pagrindinius silimarino junginius, pavyzdžiui, ESCh – MS, ESCh sujungta su elektroninio purškimo jonizacijos masės spektrometrija. Nustatytas flavonoidų/flavonolignanų sudėties įvairavimo pobūdis tarp komercinių silimarino preparatų gautas šio tyrimo rezultatais ir skelbtas Čekijos mokslininkų atliktuose tyrimuose ženkliai nesiskyrė. Mūsų apskaičiuoti silimarino profilio rezultatai parodė, kad tik vienas iš 10 fitopreparatų nepatenka į monografijų reglamentuojamas ribas, tačiau nustačius silimarino kieki, gauti rezultatai, parodė, kad fitopreparatų sudėties tyrimo kiekybiniai rodikliai ne visada atitinka gamintojo ženklime pateiktą informaciją.

Išvados

1. Ištyrus fitopreparatų su margalapių margainių ruošiniais tiriamuosius tirpalus ultra efektyviosios skysčių chromatografijos tandeminės – masių spektrometrijos metodu nustatyti dominuojantys biologiškai aktyvūs junginiai. Visų tirtų fitopreparatų mėginiuose nustatyti pagrindiniai silimarino junginiai – silikristinas, silidianinas, silibininas A, silibininas B, izosilibinas A, izosilibinas B. Tirtuose fitopreparatuose taip pat identifikuoti šie fenoliniai junginiai ir polifenolinės rūgštys: nereceptiniame vaistiniame preparate (1) – chino rūgštis, 3,4-dihidroksibenzoinė rūgštis, ferulo rūgštis, dikafeoilchino rūgštis, kemferol-3-O-gliukozidas, apigenino-7-gliukozidas, eriodiktiolis, kvercetino dariniai, kemferolis, pinocembrinas, chrizinas, nereceptiniame vaistiniame preparate (2) – chino rūgštis, dikafeoilchino rūgštis, kvercetin-7-gliukozidas, taksifolinas, kemferol-3-O-gliukozidas, apigenino-7-gliukozidas, eriodiktiolis, kvercetino dariniai, kemferolis, pinocembrinas, chrizinas, maisto papilde (3) – chino rūgšties dariniai, sinapo rūgštis, taksifolinas, apigenino-7-gliukozidas, eriodiktiolis, kvercetas, pinocembrinas, chrizinas, maisto papilde (5) – chino rūgšties dariniai, 3,4-dihidroksibenzoinė rūgštis, chlorogeno rūgštis, kavos rūgšties dariniai, kemferol-3-O-glukuronidas, taksifolinas, kemferol-3-O-gliukozidas, florizinas, eriodiktiolis, myricetinas, kvercetas, izoramnetinas, pinocembrinas.

2. Pritaikius ultra efektyviosios skysčių chromatografijos metodą buvo ištirta 10 komercinių fitopreparatų, kurių sudėtyje nurodytas silimarinas. Palyginus silimarino kiekybinius rodiklius, nustatyta, kad lignanoflavonų profilis įvairuoja. Nustatyta, kad silibinino A ir B sumos dalis svyravo svyravo nuo 54,69 proc. iki 67,06 proc. bendro visų flavonolignanų kiekio. Didžiausia silibinino A ir silibinino B sumos procentinė dalis buvo nustatyta nereceptinio vaistinio preparato (NV3) tiriamajame mėginyje. Ultra efektyviosios skysčių chromatografijos metodu įvertinus silimarino kiekį fitopreparatų mėginiuose, nustatyta, kad gauti rezultatai ne visada atitinka produkto ženklinime nurodytą silimarino kiekį dozuotės vienetė.

Literatūros sąrašas

1. QAVAMI, N., H. NAGHDI BADI, M.R. LABBAFI, A. MEHRAFARIN. A Review on Pharmacological, Cultivation and Biotechnology Aspects of Milk Thistle (*Silybum marianum*(L.) Gaertn.). *Journal of Medicinal Plants* [interaktyvus]. 2013, 12 (47), 19-37. [žiūrėta 2019-12-10]. Prieiga per: <http://jmp.ir/article-1-76-fa.pdf>
2. CHAMBERS, C. S., V. HOLEČKOVÁ, L. PETRÁSKOVÁ, D. BIEDERMANN, K. VALENTOVÁ, M. BUCHTA, and V. KŘEN. The silymarin composition ... and why does it matter??? *Food Research International* [interaktyvus]. 2017, 100, 339–353. [žiūrėta 2019-12-10]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0963996917303381?via%3Dihub>
3. ABENAVOLI, L., R. CAPASSO, N. MILIC, F. CAPASSO. Milk thistle in liver diseases: Past, present, future. *Phytother. Res* [interaktyvus]. 2010, 24, 1423–1432. [žiūrėta 2019-12-10]. Prieiga per: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ptr.3207>
4. PORWAL, O., M.S.M. AMEEN, E.T. ANWER, S. UTHIRAPATHY, J. AHAMAD, A. TAHSIN. *Silybum marianum* (Milk Thistle): Review on Its chemistry, morphology, ethno medical uses, phytochemistry and pharmacological activities. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics* [interaktyvus]. 2019, 9 (5), 199-206. [žiūrėta 2019-12-10]. Prieiga per: <http://jddtonline.info/index.php/jddt/article/view/3666/2808>
5. RAO, Venketeshwer. *Phytochemicals– A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health*. Rijeka: InTech, [interaktyvus]. 2012. ISBN 9789535102960 [žiūrėta 2019-12-12]. Prieiga per: <https://www.intechopen.com/books/phytochemicals-a-global-perspective-of-their-role-in-nutrition-and-health>
6. CSUPOR, D., A. CSORBA, J. HOHMANN. Recent advances in the analysis of flavonolignans of *Silybum marianum*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2016, 130, 301-317.
7. RAGAŽINSKIENĖ, Ona, Silvija RIMKIENĖ, ir Valdas SASNAUSKAS. *Vaistinių augalų enciklopedija*. Kaunas: Lututė, 2005. 113-115 p.
8. Margalapis [margainis.](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Illustration_Silybum_marianum0.jpg) Prieiga internetu: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Illustration_Silybum_marianum0.jpg
9. ABENAVOLI, L., R. CAPASSO, N. MILIC, F. CAPASSO. Milk thistle in liver diseases: past, present, future. *Phytotherapy Research* [interaktyvus]. 2010, 24 (10), 1423-1432. [žiūrėta 2019-12-13]. Prieiga per: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/ptr.3207>
10. WU, J.W., L.C. LIN, S.C. HUNG, C.W. CHI, T.H. TSAI. Analysis of silibinin in rat plasma and bile for hepatobiliary excretion and oral bioavailability application. *J. Pharm. Biomed. Anal* [interaktyvus]. 2007, 45 (4), 635-641. [žiūrėta 2019-12-14]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708507003883?via%3Dihub>
11. European pharmacopoeia. Fifth Edition. Volume 2. Strasbourg: Council of Europe; 2005. p. 1099-1100.
12. National Library of Medicine. PubChem. [interaktyvus][žiūrėta 2019-12-15]. Prieiga per: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Silibinin>
13. BIEDERMANN, D., E. VAVRIKOVA, L. CVAK, V. KREN. Chemistry of silybin. *Nat. Prod. Rep* [interaktyvus]. 2014, 31, 1138–1157. [žiūrėta 2019-12-15]. Prieiga per: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2014/np/c3np70122k/unauth#!divAbstract>

14. BIEDERMANN, D., E. VAVŘÍKOVÁ, L. CVAK, V. KŘEN. Chemistry of silybin. *Natural Product Reports* [interaktyvus]. 2013, 00 (1-3), 1-24. [žiūrėta 2020-02-12]. Prieiga per: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2014/np/c3np70122k/unauth#!divAbstract>
15. ZARRELLI, A., V. ROMANUCCI, C. TUCCILLO, A. FEDERICO, C. LOGUERCIO, R. GRAVANTE, G. Di FABIO. New silibinin glyco-conjugates: Synthesis and evaluation of antioxidant properties. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* [interaktyvus]. 2014, 24 (22), 5147-5149. [žiūrėta 2020-02-16]. Prieiga per: <https://www.iris.unina.it/retrieve/handle/11588/593071/280804/Zarrelli%20et%20al.%20-%202014%20-%20New%20silibinin%20glyco-conjugates%20Synthesis%20and%20evaluation%20of%20antioxidant%20properties.pdf>
16. EUROPEAN SCIENTIFIC COOPERATIVE ON PHYTOTHERAPY. *The Scientific Foundation for Herbal Medicinal Products. Second Edition*. Thieme, 2009. ISBN 9781901964080.
17. POST-WHITE, J., E.J. LADAS, K.M. KELLY. Advances in the use of milk thistle (*Silybum marianum*). *Integr Cancer Ther*. 2007, 6 (2), 104–9.
18. COMMITTEE ON HERBAL MEDICINAL PRODUCTS. Assessment report on *Silybum marianum* (L.) Gaertn., fructus. European Medicines Agency. 2018.
19. RAMASAMY, K., R. AGARWAL. Multitargeted therapy of cancer by silymarin. *Cancer Letters* [interaktyvus]. 2008, 269 (2), 352-362. [žiūrėta 2020-02-18]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304383508002619?via%3Dihub>
20. SURAI, P.F. Silymarin as a Natural Antioxidant: An Overview of the Current Evidence and Perspectives. *Antioxidants* [interaktyvus]. 2015, 4 (1), 204-247. ISSN 2076-3921. [žiūrėta 2020-02-22]. Prieiga per: <https://www.mdpi.com/2076-3921/4/1/204>
21. RASOOL, M., J. IQBAL, A. MALIK, H.S. RAMZAN, M.S. QURESHI, M. ASIF, M.H. QAZI, M.A. KAMAL, A.G.A. CHAUDHARY, M.H. AL-QAHTANI, S.H. GAN, S. KARIM. Hepatoprotective Effects of *Silybum marianum* (Silymarin) and *Glycyrrhiza glabra* (Glycyrrhizin) in Combination: A Possible Synergy. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* [interaktyvus]. 2014, 2014 (641597), 1-9. [žiūrėta 2020-02-25]. Prieiga per: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/87559129.2016.1261300?scroll=top&needAccess=true>
22. ZHANG, Z.S., S. WANG, H. LIU, B.Z. LI, L. CHE. Constituents and thermal properties of milk thistle seed oils extracted with three methods. *LWT* [interaktyvus]. 2020, 126. [žiūrėta 2020-02-28]. Prieiga per: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5751185/>
23. SHAKER, E., H. MAHMOUD, S. MNAA. Silymarin, the antioxidant component and *Silybum marianum* extracts prevent liver damage. *Food Chem Toxicol* [interaktyvus]. 2010, 48 (3), 803–806. [žiūrėta 2020-02-23]. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2009.12.011>
24. SOTO, C., E. RECOBA, H. BARRÓN, C. ALVAREZ, L. FAVARI. Silymarin increases antioxidant enzymes in alloxan-induced diabetes in rat pancreas. *Comp Biochem Physiol - C Toxicol Pharmacol* [interaktyvus]. 2003, 136 (3), 205–512. [žiūrėta 2020-02-23]. Prieiga per: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14659454/>
25. WU, J.W., L.C. LIN, T.H. TSAI. Drug–drug interactions of silymarin on the perspective of pharmacokinetics. *Journal of Ethnopharmacology* [interaktyvus]. 2009, 121 (2), 185-193. [žiūrėta 2020-03-22]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874108006211?via%3Dihub>

26. KREN, V., D. WALTEROVÁ. Silybin and Silymarin--New Effects and Applications. *Biomed. Papers* [interaktyvus]. 2005, 149 (1), 29–41. [žiūrėta 2020-02-25]. Prieiga per: <https://biomed.papers.upol.cz/pdfs/bio/2005/01/02.pdf>
27. POLYAK, S.J., C. MORISHIMA, M.C. SHUHART, C.C. WANG, Y. LIU, D.Y. LEE. Inhibition of T-Cell Inflammatory Cytokines, Hepatocyte NF-κB Signaling, and HCV Infection by Standardized Silymarin. *Gastroenterology* [interaktyvus]. 2007, 132 (5), 1925–1936. [žiūrėta 2020-03-02]. Prieiga per: [https://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085\(07\)00395-2/fulltext?referrer=https%3A%2F%2Fwww.ncbi.nlm.nih.gov%2F](https://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085(07)00395-2/fulltext?referrer=https%3A%2F%2Fwww.ncbi.nlm.nih.gov%2F)
28. GRATAGLIANO, I., C.V. DIOGO, M. MASTRODONATO, O. de BARI, M. PERSICHELLA, D. QH WANG, A. LIQUORI, D. FERRI, M.R. CARRATÙ, P.J. OLIVEIRA, P. PORTINCASA. A silybin-phospholipids complex counteracts rat fatty liver degeneration and mitochondrial oxidative changes. *World Journal of Gastroenterol* [interaktyvus]. 2013, 19 (20), 3007-3017. [žiūrėta 2020-03-05]. Prieiga per: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3662940/>
29. GOUWY, M., S. STRUYF, P. PROOST, J. VAN DAMME. Synergy in cyto-kine and chemokine network amplifies the inflammatory response. *Cytokine Growth Factor Rev* [interaktyvus]. 2005, 16, 561-580. [žiūrėta 2020-03-09]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359610105000730?via%3Dihub>
30. JUMA'A, K.M., Z.A. AHMED, I.T. NUMAN and S.A.R. HUSSAIN. Dose-dependent anti-inflammatory effect of silymarin in experimental animal model of chronic inflammation. *African journal of pharmacy and pharmacology* [interaktyvus]. 2009, 3 (5), 242-247. ISSN 1996-0816. [žiūrėta 2020-03-10]. Prieiga per: https://www.researchgate.net/publication/216645454_Dose-dependent_anti-inflammatory_effect_of_silymarin_inexperimental_animal_model_of_chronic_inflammation
31. MORISHIMA, C., M.C. SHUHART, C.C. WANG, D.M. PASCHAL, M.C. APODACA, Y. LIU, D.D. SLOAN, T.N. GRAF, N.H. OBERLIES, D.Y. -W. LEE, K.R. JEROME, S.J. POLYAK. Silymarin inhibits in vitro T-cell proliferation and cytokine production in hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* [interaktyvus]. 2010, 138(2), 1-24. [žiūrėta 2020-03-10]. Prieiga per: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4076489/>
32. VALKOVÁ, V., H. ĎURANOVÁ, J. BILČÍKOVÁ, M. HABÁN. Milk Thistle (*Silybum Marianum*): A Valuable Medicinal Plant With Several Therapeutic Purposes. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* [interaktyvus]. 2020, 9 (4), 836-843. [žiūrėta 2020-03-15]. Prieiga per: https://www.jmbfs.org/issue/february-march-2020-vol-9-no-4/jmbfs_2092fbfs_valkova/?issue_id=6515&article_id=30
33. GAO, B. and R. BATALER. Alcoholic liver disease: pathogenesis and new therapeutic targets. *Gastroenterology* [interaktyvus]. 2011, 141, 1572–1585. [žiūrėta 2020-03-17]. Prieiga per: <https://www.clinicalkey.com/#!/content/playContent/1-s2.0/S0016508511012285?returnurl=https:%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0016508511012285%3Fshowall%3Dtrue&referrer=https:%2F%2Fwww.ncbi.nlm.nih.gov%2F>
34. ACHUFUSI, Ted George O., Raj K. PATEL. *Milk Thistle* [interaktyvus]. StatPearls Publishing, 2020 [žiūrėta 2020-04-24]. Prieiga per: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK541075/>
35. GHARAGOZLOO, M., E. VELARDI, S. BRUSCOLI, M. AGOSTINI, M. Di SANTE, V. DONATO, Z. AMIRGHOFAN, C. RICCARDI. Silymarin suppress CD4+ T cell activation and proliferation: effects on NF-kappaB activity and IL-2 production. *Pharmacological Research*

- [interaktyvus]. 2010, 61 (5), 405-409. [žiūrėta 2020-03-17]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043661810000022?via%3Dihub>
36. GHARAGOZLOO, M., M. KARIMI, Z. AMIRGHOFAN. Immunomodulatory effects of silymarin in patients with β -thalassemia major. *International Immunopharmacology* [interaktyvus]. 2013, 16 (2), 243-247. [žiūrėta 2020-03-17]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567576913001525?via%3Dihub>
 37. GHARAGOZLOO, M., S. JAFARI, N. ESMAEIL, E.N. JAVID, B. BAGHERPOUR and A. REZAEI. Immunosuppressive Effect of Silymarin on Mitogen-Activated Protein Kinase Signalling Pathway: the Impact on T Cell Proliferation and Cytokine Production. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* [interaktyvus]. 2013, 113, 209–214. [žiūrėta 2020-03-17]. Prieiga per: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/bcpt.12088>
 38. HACKETT, E.S., D.C. TWEDT, D.L. GUSTAFSON. Milk Thistle and Its Derivative Compounds: A Review of Opportunities for Treatment of Liver Disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine* [interaktyvus]. 2013, 27 (1), 10-16. [žiūrėta 2020-03-18]. Prieiga per: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jvim.12002>
 39. FEDERICO, A., M. DALLIO, C. LOGUERCIO. Silymarin/Silybin and Chronic Liver Disease: A Marriage of Many Years. *Molecules* [interaktyvus]. 2017, 22 (2), 191. [žiūrėta 2020-03-22]. Prieiga per: <https://www.mdpi.com/1420-3049/22/2/191/htm>
 40. JAVED, PhD, S., K. KOHLI, M. ALI. Reassessing Bioavailability of Silymarin. *Alternative Medicine Review* [interaktyvus]. 2011, 16 (3), 239-249. [žiūrėta 2020-03-22]. Prieiga per: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21951025>
 41. Pradhan S. C., Girish C. Hepatoprotective herbal drug, silymarin from experimental pharmacology to clinical medicine. Iš *Indian J Med Res* [Interaktyvus]. 2006 [žiūrėta 2020-03-23]. Prieiga per internetą: http://www.redorbit.com/news/health/917767/hepatoprotective_herbal_drug_silymarin_from_experimental_pharmacology_to_clinical_medicine/
 42. BAI, T.C., J.J. ZHU, J. HU, H.L. ZHANG, C.G. HUANG. Solubility of silybin in aqueous hydrochloric acid solution. *Fluid Phase Equilibria* [interaktyvus]. 2007, 254 (1–2), 204–210. [žiūrėta 2020-03-25]. Prieiga per: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6600503/>
 43. THEODOSIOU, E., K. PURCHARTOVÁ, H. STAMATIS, F. KOLISIS, V. KŘEN. Bioavailability of silymarin flavonolignans: drug formulations and biotransformation. *Phytochemistry Reviews* [interaktyvus]. 2014, 13, 1-18. [žiūrėta 2020-03-25]. Prieiga per: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6121260/>
 44. NASR, S.S., M.M.A. NASRA, H.A. HAZZAH, O.Y. ABDALLAH. Mesoporous silica nanoparticles, a safe option for silymarin delivery: preparation, characterization, and in vivo evaluation. *Drug Delivery and Translational Research* [interaktyvus]. 2019, 9 (5), 968-979. [žiūrėta 2020-03-27]. Prieiga per: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs13346-019-00640-3>
 45. VALSTYBINĖ VAISTŲ KONTROLĖS TARNYBA. *Valstybinė vaistų kontrolės tarnyba*. 2015 [interaktyvus]. [žiūrėta 2020-02-25]. Prieiga per: <https://www.vvkt.lt/index.php?442909019>
 46. XIE, Y., D. ZHANG, J. ZHANG, J. YUAN. Metabolism, Transport and Drug–Drug Interactions of Silymarin. *Molecules* [interaktyvus]. 2019, 24 (20), 3693. [žiūrėta 2020-03-27]. Prieiga per: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6832356/>
 47. MIRANDA, S.R., J.K. LEE, K.L.R. BROUWER, Z. WEN, P.C. SMITH and R.L. HAWKE. Hepatic Metabolism and Biliary Excretion of Silymarin Flavonolignans in Isolated Perfused Rat

- Livers. *Drug Metab Dispos* [interaktyvus]. 2008, 36 (11), 2219–2226. [žiūrėta 2020-03-28]. Prieiga per: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3226378/>
48. CALANI, L., F. BRIGHENTI, R. BRUNI, D. DEL RIO. Absorption and metabolism of milk thistle flavanolignans in humans. *Phytomedicine* [interaktyvus]. 2012, 20 (1), 40-46. [žiūrėta 2020-04-01]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944711312003145?via%3Dihub>
49. LORENZ, D., P.W. LUCKER, W.H. MENNICKE, N. WETZELSBERGER. Pharmacokinetic studies with silymarin in human serum and bile. *Methods Find. Exp. Clin. Pharm* [interaktyvus]. 1984, 6, 655–661. [žiūrėta 2020-04-01]. Prieiga per: <https://europepmc.org/article/med/6513680>
50. DUFOUR, Jean-Francois and Pierre-Alain CLAVIEN. *Signaling Pathways in Liver Diseases*. Springer, 2010. ISBN 9783642001499.
51. STUMBRYŠ, D., D. JASILIONIS, D. AMBROZAITIENĖ, V. STANKŪNIENĖ. Demografiniai praradimai susiję su alkoholio vartojimu: Lietuvos Respublikos 2011 m. visuotinio gyventojų ir būstų surašymo ir mirtingumo duomenų jungimo tyrimas. *Lietuvos statistikos darbai* [interaktyvus]. 2014, 53 (1), 15-23. [žiūrėta 2020-04-05]. Prieiga per: <https://www.zurnalai.vu.lt/statisticsjournal/article/view/13890/12808>
52. POLIAKOVIENĖ, R. ir R. GUREVIČIUS. Mirtingumo nuo alkoholinės kepenų ligos ir kepenų cirozės sekuliariniai pokyčiai Lietuvoje 1968–2007 m. *Visuomenės sveikata* [interaktyvus]. 2010, 2 (49), 23-32. [žiūrėta 2020-04-10]. Prieiga per: <http://www.hi.lt/uploads/pdf/visuomenes%20sveikata/Vs%202010-2.pdf>
53. LOGUERCIO, C. and D. FESTI. Silybin and the liver: From basic research to clinical practice. *World J Gastroenterol* [interaktyvus]. 2011, 17 (18), 2288–2301. [žiūrėta 2020-04-14]. Prieiga per: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3098397/>
54. BRANTLEY, S.J., N.H. OBERLIES, D.J. KROLL, M.F. PAINE. Two flavanolignans from milk thistle (*Silybum marianum*) inhibit CYP2C9-mediated warfarin metabolism at clinically achievable concentrations. *J Pharmacol Exp Ther* [interaktyvus]. 2010, 332, 1081–1087. [žiūrėta 2020-04-15]. Prieiga per: <http://jpet.aspetjournals.org/content/332/3/1081>
55. SOTO, C., J. Pérez, V. García, E. Uría, M. Vadillo, L. Raya. Effect of silymarin on kidneys of rats suffering from alloxan-induced diabetes mellitus. *Phytomedicine* [interaktyvus]. 2010, 17, 1090–1094. [žiūrėta 2020-04-18]. Prieiga per: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0944711310001443>
56. BAHMANI, M., H. SHIRZAD, S. RAFIEIAN and M. RAFIEIAN-KOPAEI. Silybum marianum: Beyond Hepatoprotection. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine* [interaktyvus]. 2015, 20 (4), 292-301. [žiūrėta 2020-04-18]. Prieiga per: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/2156587215571116>
57. CHOWDHURY, W.K., S. ARBEE, S. DEBNATH, S.M. Bin ZAHUR, S. AKTER, A K M R. KARIM, M.M. MOHIB, A. TISHA, M.A.T. SAGOR, S. MOHIUDDIN. Potent Role of Antioxidant Molecules in Prevention and Management of Skin Cancer. *Journal of Clinical & Experimental Dermatology Research* [interaktyvus]. 2017, 8 (3), 1-7. [žiūrėta 2020-04-18]. Prieiga per: <https://www.longdom.org/open-access/potent-role-of-antioxidant-molecules-in-prevention-and-management-of-skincancer-2155-9554-1000393.pdf>
58. KARIMI, G., M. VAHABZADEH, P. LARI, M. RASHEDINIA, M. MOSHIRI. “Silymarin”, a Promising Pharmacological Agent for Treatment of Diseases. *Iranian Journal of Basic Medical*

- Sciences* [interaktyvus]. 2011, 14 (4), 308-317. [žiūrėta 2020-04-19]. Prieiga per: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3586829/>
59. SOLEIMANI, V., P.S. DELGHANDI, S.A. MOALLEM, G. KARIMI. Safety and toxicity of silymarin, the major constituent of milk thistle extract: An updated review. *Phytotherapy Research* [interaktyvus]. 2019, 33 (6), 1627-1638. [žiūrėta 2020-04-19]. Prieiga per: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ptr.6361>
 60. BAGHBAHADORANI, F.K. and S. MIRAJ. The Impact of Silymarin on Improvement of Hepatic Abnormalities in Patients with Severe Preeclampsia: A Randomized Clinical Trial. *Electron Physician* [interaktyvus]. 2017, 9 (8), 5098-5106. [žiūrėta 2020-04-19]. Prieiga per: <http://www.ephysician.ir/index.php/browse-issues/2017/8/786-5098>
 61. GUO, H., H. CAO, X. CUI, W. ZHENG, S. WANG, J. YU, Z. CHEN. Silymarin's Inhibition and Treatment Effects for Alzheimer's Disease. *Molecules* [interaktyvus]. 2019, 24 (9), 1-17.[žiūrėta 2020-04-19]. Prieiga per: <https://www.mdpi.com/1420-3049/24/9/1748>
 62. ULLAH, H. and H. KHAN. Anti-Parkinson Potential of Silymarin: Mechanistic Insight and Therapeutic Standing. *Frontiers in Pharmacology* [interaktyvus]. 2018, 9, 422.[žiūrėta 2020-04-19]. Prieiga per: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2018.00422/full>
 63. BARCELOUX, Donald G. *Medical Toxicology of Natural Substances*. New Jersey: John Wiley & Sons, 2008.[interaktyvus]. ISBN:9780471727613. [žiūrėta 2020-04-20]. Prieiga per: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/9780470330319.fmatter>
 64. AGNOLET, S., J.W. JAROSZEWSKI, R. VERPOORTE, D. STAERK. H NMR-based metabolomics combined with HPLC-PDA-MS- SPE-NMR for investigation of standardized Ginkgo biloba preparations. *Metabolomics* [interaktyvus]. 2010, 6 (2), 292–302. [žiūrėta 2020-04-25]. Prieiga per: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20526353/>
 65. SHEN, J., K. YANG, C. SUN, M. ZHENG. Analysis of active components in salvia miltiorrhiza injection based on vascular endothelial cell protection. *Acta Pharm* [interaktyvus]. 2014, 64 (3), 325–334. [žiūrėta 2020-04-25]. Prieiga per: https://www.researchgate.net/publication/266683577_Analysis_of_Active_Components_in_Salvia_Miltiorrhiza_Injection_Based_on_Vascular_Endothelial_Cell_Protection
 66. NI, Y., Y. LAI, S. BRANDES, S. KOKOT. Multi-wavelength HPLC fingerprints from complex substances: An exploratory chemometrics study of the Cassia seed example. *Anal Chim Acta* [interaktyvus]. 2009, 647 (2), 149–158. [žiūrėta 2020-04-26]. Prieiga per: https://www.researchgate.net/publication/26660657_Multi-wavelength_HPLC_fingerprints_from_complex_substances_An_exploratory_chemometrics_study_of_the_Cassia_seed_example
 67. DING, X., X. WANG, T. XU, J. QI, H. WANG, B. YU. Comparison of Two On-Line Analysis Techniques Used for the Screening of Antioxidants in EGb 761. *Chromatographia* [interaktyvus]. 2010, 71 (5), 493–497. [žiūrėta 2020-05-01]. Prieiga per: <https://link.springer.com/article/10.1365/s10337-010-1470-8>
 68. ORAV, A., A. VIITAK, M. VAHER. Identification of bioactive compounds in the leaves and stems of *Aegopodium podagraria* by various analytical techniques. *Procedia Chem* [interaktyvus]. 2010, 2 (1), 152–160. [žiūrėta 2020-04-10]. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1016/j.proche.2009.12.022>
 69. SHI, Q., S. YAN, M. LIANG, Y. YANG, Y. WANG, W. ZHANG. Simultaneous determination of eight components in Radix Tinosporae by high-performance liquid chromatography coupled with diode array detector and electrospray tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal*

- [interaktyvus]. 2007, 43 (3), 994–999. [žiūrėta 2020-04-15]. Prieiga per: <https://europepmc.org/article/med/16730156>
70. TAN, X.J., Q. LI, X.H. CHEN, Z.W. WANG, Z.Y. SHI, K.S. BI, Y. JIA. Simultaneous determination of 13 bioactive compounds in *Herba Artemisiae Scopariae* (Yin Chen) from different harvest seasons by HPLC-DAD. *J Pharm Biomed Anal* [interaktyvus]. 2008, 47 (4–5), 847–853. [žiūrėta 2020-04-25]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0731708508002185?via%3Dihub>
71. ANTHONY, K.P., M.A. SALEH. Free Radical Scavenging and Antioxidant Activities of Silymarin Components. *Antioxidants* [interaktyvus]. 2013, 2 (4), 398–407. [žiūrėta 2020-04-21]. Prieiga per: <https://www.mdpi.com/2076-3921/2/4/398/htm>
72. LIU, W., W. OTKUR, L. LI, Q. WANG, H. HE, Y. YE, Y. ZHANG, T. HAYASHI, S. TASHIRO, S. ONODERA, T. IKEJIMA. Autophagy induced by silibinin protects human epidermoid carcinoma A431 cells from UVB-induced apoptosis. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* [interaktyvus]. 2013, 123, 23–31. [žiūrėta 2020-04-21]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1011134413000729?via%3Dihub>
73. MOORHI, C., K. KATHIRESAN. Simultaneous Estimation Of Curcumin And Silibinin Using Validated RP-HPLC-PDA Method And Its Application In Pharmaceutical Nanoformulation. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* [interaktyvus]. 2013, 5 (3), 475–478. [žiūrėta 2020-04-21]. Prieiga per: https://pdfs.semanticscholar.org/3790/8a112533428625a4820a62de55407ac0fe2e.pdf?_ga=2.176617894.2014135039.1588713748-1937832793.1540390963
74. KUKI, Á., L. NAGY, G. DEÁK, M. NAGY, M. ZSUGA, S. KÉKI. Identification of Silymarin Constituents: An Improved HPLC–MS Method. *Chromatographia* [interaktyvus]. 2012, 75, 175–180. [žiūrėta 2020-04-21]. Prieiga per: https://www.researchgate.net/publication/257495772_Identification_of_Silymarin_Constituents_An_Improved_HPLC-MS_Method
75. MEGHREJI, M.A., C.N. PATEL, J.B. DAVE, R. BADMANABAN, J.A. PATEL. Validated method for Silymarin by Spectrophotometry in Bulk drug and Pharmaceutical formulations. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* [interaktyvus]. 2010, 2 (1), 396–400. [žiūrėta 2020-04-21]. Prieiga per: <http://www.jocpr.com/articles/validated-method-for-silymarin-by-spectrophotometry-in-bulk-drug-and-pharmaceutical-formulations.pdf>
76. SASNAUSKIENĖ, S., R. FIRANTIENĖ, V. JABLONSKIENĖ. Chromatografijos metodai ir jų taikymas. *Laboratorinė medicina*. 2012, 14 (1), 33-39.
- TALEUZZAMAN, M., S. ALI, S.J. GILANI, S.S. IMAM, A. HAFEEZ. Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) - A Review. *Austin Journal of Analytical and Pharmaceutical Chemistry* [interaktyvus]. 2015, 2 (6), 1056. [žiūrėta 2020-04-22]. Prieiga per: <https://austinpublishinggroup.com/analytical-pharmaceutical-chemistry/fulltext/ajapc-v2-id1056.php>
77. CSUPOR, D., A. CSORBA, J. HOHMANN. Recent advances in the analysis of flavonolignans of *Silybum marianum*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [interaktyvus]. 2016, 130, 301-317. [žiūrėta 2020-04-22]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708516302734?via%3Dihub>
78. GRAF, T.N., N.B. CECH, S.J. POLYAK, N.H. OBERLIES. A validated UHPLC-tandem mass spectrometry method for quantitative analysis of flavonolignans in milk thistle (*Silybum*

- marianum) extracts. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [interaktyvus]. 2016, 126, 26-33. [žiūrėta 2020-04-25]. Prieiga per: https://libres.uncg.edu/ir/uncg/f/N_Oberlies_Validated_2016.pdf
79. DING, T.-M., S.-J. TIAN, Z.-X. ZHANG, D.-Z. GU, Y.-F. CHEN, Y.-H. SHI, Z.-P. SUN. Determination of active component in silymarin by RP-LC and LC/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [interaktyvus]. 2001, 26 (1), 155-161. [žiūrėta 2020-04-25]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708501003648?via%3Dihub>
80. AHMAD, N., H. FAZAL, B.H. ABBASI, S. ANWAR, A. BASIR. DPPH free radical scavenging activity and phenotypic difference in hepatoprotective plant (*Silybum marianum* L.). *Toxicology and Industrial Health* [interaktyvus]. 2012, 29 (5), 460-467. [žiūrėta 2020-04-28]. Prieiga per: https://www.researchgate.net/publication/221858329_DPPH_free_radical_scavenging_activity_and_phenotypic_difference_in_hepatoprotective_plant_Silybum_marianum_L
81. The Editors of Encyclopaedia Britannica. Phenol, chemical compound. Britania. [interaktyvus]. [žiūrėta 2020-04-26]. Prieiga per: <https://www.britannica.com/science/phenol>
82. BALASUNDRAM, N., K. SUNDRAM, S. SAMMAN. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry* [interaktyvus]. 2006, 99 (1), 191-203. [žiūrėta 2020-04-28]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814605006242?via%3Dihub>
83. SAVICKIENĖ, N., A. DAGILYTĖ, A. LUKOŠIUS, V. ŽITKEVIČIUS. Importance of biologically active components and plants in the prevention of complications of diabetes mellitus. *Medicina* [interaktyvus]. 2002, 38 (10), 970-975. [žiūrėta 2020-04-29]. Prieiga per: https://www.researchgate.net/publication/10945994_Importance_of_biologically_active_components_and_plants_in_the_prevention_of_complications_of_diabetes_mellitus
84. KUMAR, S. and A.K. PANDEY. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal* [interaktyvus]. 2013, 2013, 1-16. [žiūrėta 2020-04-30]. Prieiga per: <https://www.hindawi.com/journals/tswj/2013/162750/>
85. RASUL, A., F.M. MILLIMOUNO, W.A. ELTAYB, M. ALI, J. LI, X. LI. Pinocembrin: A Novel Natural Compound with Versatile Pharmacological and Biological Activities. *BioMed Research International* [interaktyvus]. 2013, 2013 (379850), 1-9. [žiūrėta 2020-04-30]. Prieiga per: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/379850/>
86. BAGHEL, S.S., N. SHRIVASTAVA, R.S. BAGHEL, P. AGRAWAL, S. RAJPUT. A review of quercetin: Antioxidant and anticancer properties. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* [interaktyvus]. 2012, 1 (1), 146-160. [žiūrėta 2020-04-30]. Prieiga per: https://www.researchgate.net/publication/267333748_A_review_of_quercetin_Antioxidant_and_anticancer_properties
87. TOPALA, F., M. NARA, H. GOCERB, P. KALINC, U.M. KOCYIGITC, İ. GÜLÇINCD, S.H. ALWASEL. Antioxidant activity of taxifolin: an activity–structure relationship. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* [interaktyvus]. 2016, 31 (4), 1-10. [žiūrėta 2020-05-01]. Prieiga per: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/14756366.2015.1057723>
88. ABBASI, E., M. NASSIRI-ASL, M. SHAFEEI, M. SHEIKHI. Neuroprotective Effects of Vitexin, a Flavonoid, on Pentylentetrazole-Induced Seizure in Rats. *Chemical Biology & Drug Design* [interaktyvus]. 2012, 80, 274-278. [žiūrėta 2020-05-01]. Prieiga per: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1747-0285.2012.01400.x>

89. FENCLOVA, M., A. NOVAKOVA, J. VIKTOROVA, P. JONATOVA, Z. DZUMAN, T. RUML, V. KREN, J. HAJŠLOVA, L. VITEK, M. STRANSKA-ZACHARIASOVA. Poor chemical and microbiological quality of the commercial milk thistle-based dietary supplements may account for their reported unsatisfactory and non-reproducible clinical outcomes. *Scientific Reports* [interaktyvus]. 2019, 9 (11118), 1-12. [žiūrėta 2020-05-01]. Prieiga per: <https://europepmc.org/article/pmc/pmc6668463#free-full-text>
90. Quality Guide. Prieiga internetu: <https://ehpm.org/attachments/article/117/EHPM%20Quality%20Guide%20101214.pdf>
91. EVANS, William Charles, Daphne EVANS. An overview of drugs with antihepatotoxic and oral hypoglycaemic activities: Iš: EVANS, William Charles, Daphne EVANS. *Trease and Evans' Pharmacognosy*. Elsevier, 2009, pp. 436-444. ISBN 9780702029332.
92. PubChem. Prieiga internetu: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
93. BRINDA, B.J., H.-J. ZHU, J. S. MARKOWITZ. A sensitive LC–MS/MS assay for the simultaneous analysis of the major active components of silymarin in human plasma. *Journal of Chromatography B* [interaktyvus]. 2012, 902, 1-9. [žiūrėta 2020-05-15]. Prieiga per: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S157002321200339X?casa_token=KAF62EyEO5wAAAAA:3HDxALQqbbPyc-SdJtiGDN9o-L2KLXtyfd6upndU4njclHN6RUHqaBJPpDpFgIRIcdHyIshd_u8