

STANOVENÍ SILYBINU V KREVŇÍ PLAZMĚ VYSOKOÚČINNOU KAPALINOVOU CHROMATOGRAFIÍ S EXTRAKCÍ NA PEVNÉ FÁZI

PAVEL KOSINA^a a JOSEF BARTEK^b

^aCentrum analytické chemie molekulárních struktur, Univerzita Palackého, Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc, e-mail: kosina@tunw.upol.cz, ^bÚstav lékařské chemie a biochemie, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého, Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc

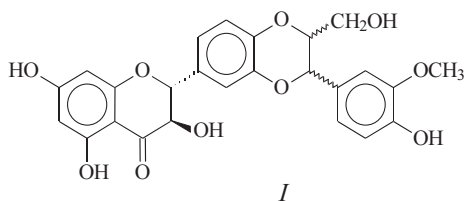
Došlo dne 18.X.1999

Klíčová slova: kapalinová chromatografie, konjugovaný a celkový silybin, plazma

Úvod

Silymarin, přečištěný extrakt ze semen ostropestřce mariánského – *Silybum marianum* (L.) Gaertn., patří v druhé polovině dvacátého století k intenzivně sledovaným látkám z hlediska farmakologického účinku¹. Je možno nalézt několik set odborných článků, zabývajících se studiem silymarinu nebo jeho jednotlivých komponent¹⁻⁴.

Silymarin a jeho hlavní obsahový flavonolignan silybin (*I*) vykazuje širokou paletu ochranných účinků proti poškození organismu toxiny¹. Chrání proti celé řadě jaterních jedů, např. tetrachlormethanu, D-galaktosaminu, thaliu, acetaminofenu¹. V organismu působí flavonolignany ze silymarinu jako antioxidanty, vychytávají volné radikály, stabilizují buněčné membrány, ovlivňují hladiny sérových lipidů, mají antiproliferativní účinky na celou řadu nádorů^{5,6}. Významným účinkem silymarinu je jeho schopnost přispívat k regeneraci jaterní tkáně. Při akutních otravách toxiny muchomůrky zelené (*Amanita phalloides*) se používá silybin ve formě bishemisukcinátu jako účinné antidotum¹.



V současné době se přípravky na bázi silymarinu používají nejen jako léčiva, ale stále více také jako potravinové doplňky zdravé výživy, hlavně v západní Evropě a USA⁴, jejich obliba stále stoupá v souladu se snahou o zdravý životní styl. Zatímco léky jsou pod přísnou kontrolou z hlediska jejich schvalování, distribuce i monitorování v organismu, pro potravinové doplňky není k dispozici dostatek vhodných metod ke sledování těchto látek v biologických materiálech. Vzhledem k interindividuálním rozdílům v citlivosti populace k medikamentům obecně je řešení tohoto problému velmi důležité.

První metody stanovení silybinu (SB) v krevním séru a moči

využívaly tenkovrstevné chromatografie s fluorimetrickou detekcí po extrakci do etheru⁷. Největšího uplatnění našly metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie⁸⁻¹¹. Všechny použité metody stanovují pouze SB, ani jedna nesleduje přímo jeho metabolity, konjugáty s kyselinou glukuronovou a sírovou. Ty jsou před chromatografickou analýzou enzymově štěpeny β -glukuronidasou a sulfatasou, stanoven je celkový obsah, zahrnující nekonjugovaný i původně konjugovaný SB.

Silybin existuje ve formě dvou diastereomerů, ale pouze některé postupy umožňují jejich stanovení vedle sebe^{8,9}. Všechny popisované postupy využívají více či méně složité přečištění před vlastní HPLC analýzou. Martinelli et al.¹⁰ stanovoval SB v lidské plazmě a moči po extrakci *tert*-butylmethyletherem během desetiminutové analýzy, ale bez rozdělení diastereomerů. K rozdělení diastereomerů nedochází ani v případě studie Morazzoniho et al.¹¹, srovnávající farmakokineticky silipid (1:1 komplex fosfatidylcholinu se SB) a silymarin za použití sorbentu Extrelut 3. Diethylether použili k extrakci Rickling et al.⁸ i Mascher et al.⁹ Ten zvolil k přečištění vzorku postup, zahrnující po extrakci diethyletherem vymražení vodné fáze suchým ledem s acetonem, smíchání organické fáze s roztokem Na₂CO₃, okyselení vodné fáze a nástřik na HPLC kolonu. Cílem naší práce bylo modifikovat již dříve publikované metody tak, aby bylo možno co možná nejjednodušší preseparací získat analyt vhodný pro HPLC stanovení ze vzorků krevní plazmy za zachování separace diastereomerů. Prezentovaná metoda je modifikací metod, použitých při studiu flavonolignanů v rostlinném materiálu^{12,13} a metody využití ke stanovení glykosidů SB v biologických materiálech¹⁴. Metoda byla aplikována na vzorky plazmy dvou zdravých dobrovolníků.

Experimentální podmínky

Chemikálie: Silymarin (Favea, Česká republika) – 200 mg silymarinu v jedné tabletě, Legalon[®] 70 (Madaus AG, Německo) – 70 mg silymarinu v jedné tabletě, silybin (Galena Opava, Česká republika), kyselina octová p.a., methanol p.a. (MeOH), redestilovaná voda, octan sodný p.a., aceton p.a., směs β -glukuronidasa/arylsulfatasa (40/20 U.ml⁻¹) z *Helix pomatia* (Merck, Německo).

Biologický materiál: Plazma byla získána od dvou dobrovolníků A a B, kteří měsíc před experimentem užívali třikrát denně 1 tabletu Silymarinu (Favea) – dobrovolník A nebo 1 tabletu Legalon[®] 70 (Madaus AG) – dobrovolník B. Dvacet čtyři hodin před odběrem oba dobrovolníci neměli nadměrnou fyzickou zátěž, nekouřili, vyvarovali se nápojů a potravin, obsahujících xanthin, jako je káva, čaj a čokoláda. Hladověli od večera před experimentem a během experimentu. Krev byla odebírána do zkumavek s EDTA v časových intervalech 0,5, 1, a 2 hodiny od podání tablety příslušných preparátů. Ihned po odběru byla centrifugací získána plazma, která byla před dalším použitím zamrazena při –20 °C. Plazma pro zjištění návratnosti SB z biologického materiálu byla získána od dobrovolníků, kteří neužívali žádné léky ani potravinové doplňky, obsahující silymarin.

Kapalinová chromatografie: Kapalinový chromatograf Shimadzu Class - LC 10 (Shimadzu, Japonsko) byl v uspořádání odplynovací jednotka GT-104, pumpa LC 10AT, termostat CTO-10AC, DAD detektor SPD-M10AVP, centrální

ní jednotka CBM-10A, autoinjektor SIL-10ADvp s dávkovací smyčkou 500 μl . Separace byla prováděna na koloně 250/4 Nucleosil 100-5 C₁₈ AB, předkolona 11/4 stejný sorbent (Macherey Nagel, SRN). Stanovení bylo provedeno v gradientu mobilní fáze (složka A: MeOH-H₂O-CH₃COOH 37:63:0,5; složka B: MeOH, program gradientu je uveden v tabulce I). HPLC analýzy byly prováděny při teplotě kolony 30 °C, průtoku 0,9 ml.min⁻¹ a detekci při 290 nm, nastříkované množství bylo 50 μl .

Tabulka I
Program gradientu mobilní fáze

Čas, min	0	3,75	11,25	15	20	20,1	27
% B	0	10	35	100	100	0	STOP

Příprava analytického vzorku

1. Extrakce nekonjugovaného silybinu na pevné fázi

K 1 ml krevní plazmy bylo přidáno 2 ml acetátového pufru – AC (0,1 mol.l⁻¹, pH 4). Směs byla nanášena na prekondicionovaný sorbent (Spe-ed Octadecyl C18/18 %, 200 mg/3 ml (Applied Separations, USA), kondicionován MeOH (2×2 ml), H₂O (2 ml) a AC (1 ml)). Kolonka byla promyta AC (1 ml). Analyt byl desorbován MeOH (2×2 ml) a acetonem (1 ml) do zkumavky, následovala centrifugace při 2 000 g/12 °C/1 min. Po centrifugaci byl supernatant přefiltrován přes filtr 0,45 μm (Sartorius, Německo) a odpařen na vakuové rotační odparce při 45 °C do sucha. Odparek byl rozpuštěn v 100 μl mobilní fáze A a aplikován na HPLC kolonu.

2. Stanovení celkového silybinu

K 1 ml krevní plazmy bylo přidáno 1,5 ml AC a 60 μl roztoku směsi β -glukuronidasa/arylsulfatasa, o aktivitě 0,56/0,28 U.ml⁻¹ (cit.¹⁵). Zkumavky byly uzavřeny gumovou zátkou, inkubovány 4 hod při 37 °C ve vibrační vodní lázni, poté doplněny 0,5 ml AC a zpracovány stejným extrakčním postupem jako v bodu 1.

Příprava standardních roztoků

Byl připraven zásobní roztok SB o koncentraci 500 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ v MeOH. Protože v této práci použitý SB je směs dvou diastereomerů v poměru 1:1, koncentrace každého diastereomeru v zásobním roztoku byla 250 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Ze zásobního roztoku byly naředěním v plazmě připraveny kalibrační roztoky, obsahující 0,005; 0,025; 0,05; 0,25; 2,5 a 25 $\mu\text{mol.l}^{-1}$

Tabulka II
Návratnost silybinu z lidské plazmy při extrakci na sorbent C₁₈

Koncentrace silybinu ^a , $\mu\text{mol.l}^{-1}$	0,005	0,025	0,05	0,25	2,5	25
Návratnost, %	92,4±7,2	91,7±5,8	89,4±6,7	85,1±6,3	82,8±8,4	80,5±7,6

^a Průměr ± směrodatná odchylka, $n = 3$; návratnost obou diastereomerů byla stejná, proto je v tabulce uváděn pouze jeden údaj

jednotlivých diastereomerů. Pro stanovení návratnosti SB z biologického materiálu byly připraveny standardní roztoky v mobilní fázi A ve stejných koncentracích.

Výsledky a diskuse

Použitou metodou je možno separovat diastereomery SB, retenční časy jsou 17,7 a 18,1 min, rozlišení píků $R_{ij} = 1,22$. Rovnice kalibračních přímk pro každý diastereomer (I a II), sestrojené v koncentračním rozsahu 0,005 až 25 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ každého diastereomeru mají tvar:

$$c_{\text{I}} = 1,781 \cdot 10^{-5} \quad P - 0,018 \cdot r^2 = 0,99999$$

$$c_{\text{II}} = 1,554 \cdot 10^{-5} \quad P - 0,017 \cdot r^2 = 0,99998$$

c – koncentrace diastereomeru [$\mu\text{mol.l}^{-1}$]

P – plocha píku [$\mu\text{V.s}$]

Mez detekce pro každý diastereomer je 2 nmol.l⁻¹, mez stanovitelnosti 5 nmol.l⁻¹ nekonjugovaného i celkového SB. Program

Tabulka III

Koncentrace silybinu [nmol.l^{-1}] ve vzorcích plazmy dobrovolníka A po podání jedné tablety Silymarin (Favea)

Čas odběru ^a , hod	Silybin			
	nekonjugovaný		celkový	
	D I ^b	D II ^b	D I ^b	D II ^b
0,5	49,2±2,9	21,6±2,7	46,5±3,1	40,2±4,4
1	86,5±1,5	31,7±2,3	88,0±10,2	48,5±4,1
2	133,0±9,5	35,1±4,4	176,1±7,7	200,6±8,1

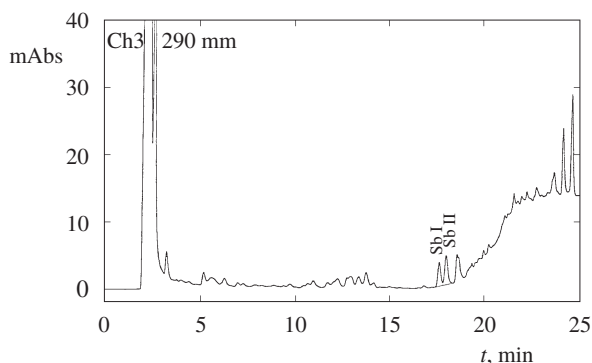
^a Čas odběru krve po podání preparátu, ^b průměr ± směrodatná odchylka, $n = 2$; D = diastereomer

Tabulka IV

Koncentrace silybinu [nmol.l^{-1}] ve vzorcích plazmy dobrovolníka B po podání jedné tablety Legalon[®]70

Čas odběru ^a , hod	Silybin			
	nekonjugovaný		celkový	
	D I ^b	D II ^b	D I ^b	D II ^b
0,5	25,5±3,5	n.d. ^c	30,9±6,6	6,8±1,0
1	25,5±4,8	8,9±2,5	52,9±4,4	82,2±8,7
2	139,0±15,6	7,5±3,7	127,0±14,7	67,6±12,0

^a Čas odběru krve po podání preparátu, ^b průměr ± směrodatná odchylka, $n = 2$, ^c nedetekováno; D = diastereomer



Obr. 1. Stanovení celkového silybinu (jednotlivých diastereomerů) ve vzorku plazmy dobrovolníka A po 2 hod od podání jedné tablety Silymarinu (Favea) po enzymatickém štěpení konjugovaného silybinu

gradientu (tab. I) zajišťuje na konci analýzy vymytí balastních látek, hydrofobnějších než silybin, z kolony a zároveň návrat do původního stavu. Návratnost SB je uvedena v tabulce II. Byly sledovány změny koncentrací diastereomerů SB v čase v plazmě dvou dobrovolníků po podání jedné tablety preparátů Silymarin a Legalon[®]70 (tab. III a IV). Chromatogram stanovení celkového silybinu (jednotlivých diastereomerů) ve vzorku plazmy dobrovolníka A po 2 hod od podání jedné tablety Silymarinu (Favea) po enzymatickém štěpení konjugovaného silybinu a extrakci na pevné fázi zachycuje obr. 1.

V porovnání s metodou Maschera et al.⁹ je prezentovaná metoda stejně citlivá pro stanovení nekonjugovaného SB a citlivější o polovinu při stanovení celkového SB (metoda Maschera et al. dovoluje stanovit koncentraci 10 nmol.l⁻¹ každého diastereomeru celkového SB), metoda Ricklinga et al.⁸ dovoluje stanovit každý diastereomer v koncentraci 0,5 nmol.l⁻¹ pro nekonjugovaný SB ovšem při použití přepínání kolon a elektrochemického detektoru. Pro celkový SB má prezentovaná metoda stejnou citlivost jako metoda Ricklinga et al.⁸

Výhodou použití C₁₈ sorbentu při extrakci na pevnou fázi je možnost zachytit i hydrofilnější deriváty silybinu, např. β-D-glykosidy SB¹⁴, které extrakcí do diethyletheru stanovit nelze. V současné době probíhají experimenty s využitím prezentované metody pro stanovení přirozených metabolitů SB v krevní plazmě.

Návratnost SB z krevní plazmy při použití extrakce na pevnou fázi se pohybovala okolo 85 % za dostatečného přečištění vzorků.

Ve vzorcích plazmy po aplikaci obou přípravků byly nalezeny v časové závislosti vzrůstající koncentrace jak nekonjugovaného, tak i celkového SB u diastereomeru I, u dobrovolníka A se stejný trend uplatňoval i u diastereomeru II. U dobrovolníka B byl rozdíl v koncentraci diastereomeru II po jedné a dvou hodinách od aplikace preparátu nevýznamný. Pozorovaný rozdíl v koncentraci diastereomerů I a II v krevní plazmě je v souladu s literárními údaji¹⁵. Není známo, zda se jedná o rozdílnou resorpci diastereomerů z gastrointestinálního traktu, různou rychlost biotransformace a vylučování nebo kombinaci všech těchto vlivů.

Preparát Silymarin (Favea) obsahoval trojnásobné množství silymarinu než Legalon[®]70, rozdíl v plazmatické koncentraci

(hlavně u diastereomeru I) neodpovídá aplikovanému množství a svědčí pro rozdílnou biodostupnost preparátů odlišných výrobců, což bylo pozorováno také v práci Schulze et al.¹⁶ Významnou roli v odlišné biodostupnosti mohou hrát také interindividuální rozdíly, které mohou posuzování biodostupnosti různých preparátů výrazně ovlivňovat¹⁵.

Tato práce byla podpořena granty MŠMT ČR VS 96021 a MSM 151100003, MPO PP-ZI/13/99.

LITERATURA

1. Morazzoni P., Bombardelli E.: *Fitoterapia* 66, 3 (1995).
2. Jegorov A.: *Chem. Listy* 90, 859 (1996).
3. Leng-Peschlow E., Strenge-Hesse A.: *Z. Phytother.* 12, 162 (1991).
4. Flora K., Hahn M., Rosen H., Benner K.: *Am. J. Gastroenterol.* 93, 139 (1998).
5. Katiyar S. K., Korman N. J., Mukhar H., Agarwal R.: *J. Natl. Cancer Inst.* 89, 556 (1997).
6. Zi X., Grasso A. W., Kung H. J., Agarwal R.: *Cancer Res.* 58, 1920 (1998).
7. Lorenz D., Lückner P. W., Mennicke W. H., Wetzelsberger N.: *Meth. Find. Clin. Pharmacol.* 6, 655 (1984).
8. Rickling B., Hans B., Kramarczyk R., Krumbiegel G., Weyhenmeyer R.: *J. Chromatogr.* B 670, 267 (1995).
9. Mascher H., Kikuta Ch. Weyhenmeyer R.: *J. Liquid Chromatogr.* 16, 2777 (1993).
10. Martinelli E. M., Morazzoni P., Livio S., Uberti S.: *J. Liquid Chromatogr.* 14, 1285 (1991).
11. Morazzoni P., Montalbetti A., Malandrino S., Pifferi G.: *Eur. J. Drug. Metab. Pharmacokin.* 18, 289 (1993).
12. Tittel G., Wagner H.: *J. Chromatogr.* 135, 499 (1977).
13. Tittel G., Wagner H.: *J. Chromatogr.* 153, 227 (1978).
14. Kosina P., Kubisch J., Walterová D.: *Chem. Listy* 91, 704 (1997).
15. Weyhenmeyer R., Mascher H., Birkmayer J.: *Int. J. Clin. Pharm. Ther. Tox.* 30, 134 (1992).
16. Schulz H. U., Schurer M., Krumbiegel G., Wachter W., Weyhenmeyer R., Seidel G.: *Arzneim.-Forsch* 45, 61 (1995).

P. Kosina^a and J. Bartek^b (^aCentre for Bioanalytical Research, Palacký University, ^bInstitute of Medical Chemistry and Biochemistry, Medical Faculty, Palacký University, Olomouc): **Determination of Silybin in Blood Plasma Using High Performance Liquid Chromatography with Solid Phase Extraction**

HPLC method with SPE preseparation step for determination of silybin, the main constituent of silymarin, in blood plasma was optimized. A C18 sorbent for preseparation from acidified samples was used. Diastereomers of silybin in unconjugated form or total silybin are resolved by the method, the detection limit being 2 nmol.l⁻¹ and the limit of quantification 5 nmol.l⁻¹ per diastereomer. The method is suitable for silybin monitoring in human plasma after administration of drugs or food additives based on silymarin.