

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální a makromolekulární chemie

**PREPARATIVNÍ DIASTEREOMERNÍ
DĚLENÍ SILYBINU A JEHO SULFÁTŮ
POMOCÍ RP-HPLC**

Bakalářská práce

studijního oboru Chemie životního prostředí

Praha 2010

Petra Kolářová

Tato bakalářská práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru a za podpory grantů MŠMT LC06010, OC08049, ME10027 a GAČR 303/08/0658.

Práce byla vypracována v Laboratoři Biotransformací Mikrobiologického ústavu Akademie věd České republiky v Praze, od září 2009 do června 2010.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitelky doc. RNDr. Evy Tesařové, CSc. a konzultantů RNDr. Davida Biedermanna, Ph.D. a prof. Ing. Vladimíra Křena, DrSc. Dále prohlašuji, že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

V Praze dne 1. června 2010

Podpis

Velice bych chtěla poděkovat své školitelce doc. Evě Tesařové za umožnění této práce a za její rady a připomínky.

Dále mnohokrát děkuji svým konzultantům Davidu Biedermannovi, Ph.D. a prof. Vladimíru Křenovi za odborné vedení, cenné rady, mnohé podněty a za velké množství času, jež mi v průběhu této práce ochotně poskytovali.

Můj dík patří také všem pracovníkům Laboratoře Biotransformací MBÚ AV ČR, kteří mi byli jakkoliv nápomocni při řešení a realizaci této práce.

Klíčová slova: silybin
silymarin
flavonoidy
flavonolignany
diastereomery
RP-HPLC

Key words: silybin
silymarin
flavonoids
flavonolignans
diastereomers
RP-HPLC

Abstrakt

Z plodů ostropestřce mariánského (*Silybum marianum*) se získává standardizovaný extrakt silymarin, jehož hlavní komponentou je silybin. Tento flavonolignan je převážně odpovědný za léčivé účinky plodů ostropestřce: antioxidační, hepatoprotektivní, chemoprotektivní a protinádorové.

Přírodní silybin se vyskytuje jako preparativně neseparovatelná ekvimolární směs diastereomerů A a B. Bylo prokázáno, že biologická aktivita silybinu A je odlišná od silybinu B, a že se v organismu konjuguje převážně na glukuronidy a sulfáty. Struktura sulfátů a jejich biologická aktivita není dosud vůbec známa.

Cílem této práce je vývoj prakticky použitelné metody pro preparativní separaci diastereomerů silybinu A a B a jeho sulfátů, které jsou považovány za jedny z hlavních metabolitů.

Byla vyvinuta původní preparativní metoda na dělení silybinu A a B v mobilní fázi tvořené 50% MeOH. Dále byla optimalizována preparativní metoda pro dělení směsi produktů vznikajících při sulfataci silybin-23-acetátu v mobilní fázi tvořené MeOH/H₂O 60/40 (v/v) s přidavkem 10 ml/l HCOOH, na chromatografické koloně Labio C18 25×250 mm.

Silymarin is standardized extract isolated from fruits of Milk Thistle plant (*Silybum marianum*). The principal component of silymarin is silybin. This flavonolignan is mainly responsible for the medicinal effects of Milk Thistle fruits: antioxidant, hepatoprotective, anticancer and chemoprotective activities.

Natural silybin exists as an equimolar mixture of diastereomers A and B whose preparative separation is very hard. It was shown that the biological activity of silybin A and B are different. Silybin in the blood conjugates mainly to sulfates. The structure or biological activity of the sulfates is not yet known.

The aim of this work is to develop practically applicable method for preparative separation of diastereomers of silybin A and B, and sulfates, which are considered as one of the major metabolites of silybin.

The preparative method for separation of silybin A and B in the mobile phase consisting of 50% MeOH on the chromatographic column Labio C18 25x250 mm, was developed.

In addition, preparative method for separation of mixture of products accrued from the sulphation of silybin-23-acetate in the mobile phase consisting of MeOH/H₂O 60/40 (v/v) with addition of 10 ml/l HCOOH, was optimized.

Seznam zkratek

ACN	acetonitril
C18	oktadecylová stacionární fáze
d.e.	diastereomerní nadbytek (%)
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
EtOH	ethanol
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
kol.	kolektiv
konc.	koncentrovaný
LC	kapalinová chromatografie
MeOH	methanol
m.f.	mobilní fáze
MS	hmotnostní spektrometrie
NMR	nukleární magnetická rezonance
PAU	polyaromatické uhlovodíky
RP-HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi
STODMF	komplex oxidu sírového s <i>N,N</i> -dimethylformamidem
STOTEA	komplex oxidu sírového s triethylaminem
t	čas
TFA	kyselina trifluoroctová
UV	ultrafialový
VIS	viditelné světlo
(v/v)	objemový poměr

Obsah

Klíčová slova, key words	4
Abstrakt	5
Seznam zkratek	6
1 Úvod	8
1.1 Cíle práce	8
2 Teoretická část	9
2.1 Ostropestřec mariánský	9
2.1.1 Složení semen ostropestřce mariánského	10
2.2 Charakterizace flavonolignanů silymarinového komplexu	12
2.3 Průmyslová izolace silybinu	12
2.4 Flavonoidy	13
2.5 Silybin	14
2.6 Diastereomery a jejich dělení	15
2.7 Princip preparativní RP-HPLC.....	16
2.8 Současný stav problematiky	17
3 Experimentální část	19
3.1 Použité chemikálie	19
3.2 Použité přístroje	19
3.3 Příprava mobilních fází a vzorků	20
3.3.1 Příprava mobilních fází a silybinu na chromatografii	20
3.3.2 Obecný postup přípravy sulfátů silybin-23-acetátu	20
4 Výsledky a diskuze	21
4.1 Vyvinutí prakticky použitelné preparativní chromatografické metody pro dělení směsi diastereomerů silybinu	21
4.2 Získání čistých diastereomerů silybinu A a silybinu B	25
4.3 Chromatografické dělení reakční směsi po sulfataci silybin-23-acetátu	27
5 Závěr	31
Literatura	32
Příloha A	34
Příloha B	35

1 Úvod

Léky jsou často vyráběny z přírodních surovin, ať už jsou to výtažky z rostlin nebo živočichů. Mnohdy mají kořeny v tradiční lidové medicíně a jsou využívány tisíce let.

Přírodní látky vznikají jako sekundární metabolity chemických reakcí probíhajících v buňkách vyšších rostlin. Všechny jejich funkce nejsou dosud známé, některé z nich slouží rostlinám například k ochraně, jiné jako atraktanty.

Mezi důležité rostlinné metabolity patří flavonoidy, které jsou zodpovědné za pozitivní biologické účinky čaje, vína, česneku či rajčat. Flavonoidy jsou ve středu zájmu mnoha vědců, především pro jejich antioxidační a chemoprotektivní vlastnosti.

Úzkou skupinou flavonoidů jsou flavonolignany, obsažené především ve fialovém bodláku ostropestřci mariánském. Jeho antioxidační, hepatoprotektivní a protinádorové účinky znali již staří Řekové. Ostropestřec patří mezi nejdéle známé a nejlépe prozkoumané léčivé rostliny. Z jeho semen se získává flavonolignany a polyfenoly obsahující extrakt, souhrnně nazývaný silymarin.

Hlavní komponentou silymarinu je silybin, díky němuž mají plody ostropestřce léčivé účinky. Z plodů je vyráběna řada průmyslových přípravků, u nás např. lék Flavobion, Legalon či Ungolen. Silybin je v silymarinu obsažen jako velmi těžce separovatelná, ekvimolární směs dvou diastereomerů A a B. V minulých letech bylo prokázáno, že biologická aktivita diastereomerů silybinu se výrazně liší, a proto je třeba vyvinout preparativní chromatografickou metodu pro jejich separaci.

1.1 Cíle práce:

- vyvinutí prakticky použitelné preparativní chromatografické metody pro dělení diastereomerů silybinu
- získat opticky čisté diastereomery silybinu
- optimalizace preparativní chromatografické metody pro dělení sulfátů silybin-23-acetátu

2 Teoretická část

2.1 Ostropestřec mariánský

Silybum marianum (LINNANEUS) GAERTNER Fruct. Sem. Pl. – Syn.: *Carduus marianus*

Ostropestřec mariánský patří mezi nejdéle známé léčivé rostliny. Pravděpodobně poprvé je popisován ve spisech Theophrasta (4. st. n. l.) pod názvem „Pternix“. Dočteme se o něm ve všech významných herbářích léčivých rostlin, např. abatyše Hildegardy z Bingenu, Hieronyma Bocka, Valentiniho či Von Hallera. [1]

Ostropestřec mariánský je 50 až 150 cm vysoká bodlákovitá rostlina (Obr. 1) se silnou větvenou lodyhou a přízemními listy v růžici, které jsou vykrajované, ostře zubaté, tuhé, lesklé a na líci často bíle skvrnité. Ostropestřec kvete od června do září, květy jsou červenofialové, zřídka bílé, v 3-5 cm velkých úborech. Plody (nažky) mají chmýří složené z chloupků. Chmýř snadno opadává, plody se sbírají od září do října. Užívají se semena (*Fructus cardui Mariae*), která se vymláťí z chmýřitých hlavic po jejich usušení.



Obr. 1 – Ostropestřec mariánský, zobrazení květu a celé rostliny

Ostropestřec je původem z Kanárských ostrovů, přes Středozeří až do Malé a Přední Asie. V současné době roste na všech kontinentech, v Evropě je zdomácnělý. Pěstuje se na polích a zahradách, svědčí mu hlinité a písčitohlinité půdy bohaté na živiny. U nás je zpravidla jednoletý, v jižní Evropě listová růžice přezimuje. [2, 3]

Z ostropestřce se využívají především semena, která obsahují 26–28 % bílkovin, 25–35 % jedlého oleje a obsah tokoferolu se pohybuje mezi 500–800 mg/kg. Hlavními nositeli

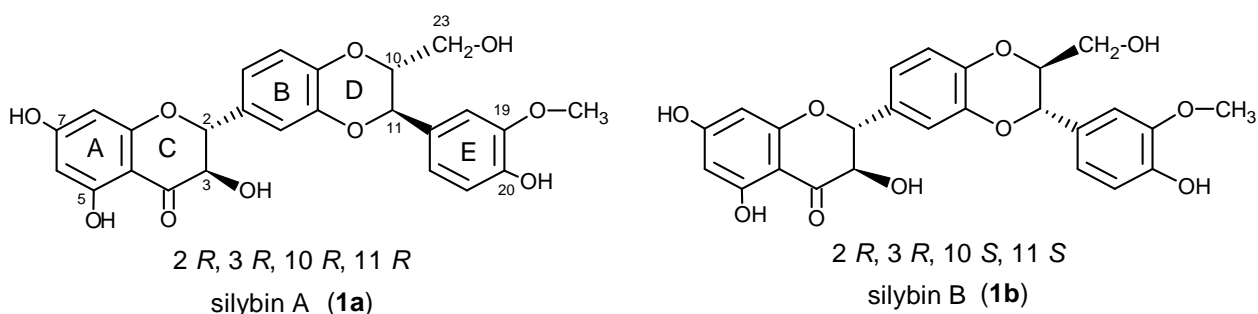
léčivých účinků jsou flavonolignany tzv. silymarinového komplexu (silybin, silydianin, silychristin a další). Nať jich obsahuje jen nepatrné množství, takže pro farmaceutický průmysl není použitelná. V České republice byl vyšlechtěn kultivar Silyb, z kterého se připravuje léčivo Flavobion. V tomto kultivaru chybí silydianin a obsahuje více silybinu (asi 2 %), který se považuje za nositele většiny terapeutických účinků ostropestřce. [3]

Po dobu mnoha staletí se semena používala jako choleretikum, při žloutence, posthepatickém syndromu, žlučnickových kamencích a při akutních i chronických zánětech jater a cirhózách. Dále při onemocnění žlučníku, dvanácterníku, sleziny a při regeneraci cév. Nať a kořeny se využívají zevně při hemeroidech, křečových žilách a bércových vředech. [4, 5]

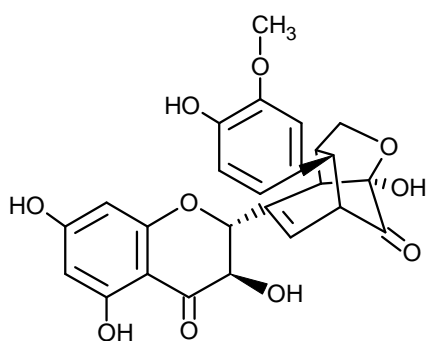
2.1.1 Složení semen ostropestřce mariánského

Ze semen ostropestřce se získává silymarin, což je komplex flavonolignanů (1,5-3 %) v němž je nejvíce zastoupen silybin (Obr. 2), ekvimolární směs diastereomerů A (**1a**) a B (**1b**), v menším množství silydianin (**2**), silychristin (**3**), isosilybin (**4**) a 2,3-dehydrosilybin (**5**). Semena dále obsahují tyramin, histamin, esenciální oleje a tuky (20-30 %), cukry, alkaloidy, saponiny, organické kyseliny, vitamíny (například C, E, K) a flavonoidy, jako jsou kvercetin (**6**) a taxifolin (**7**) (Obr. 3). [6]

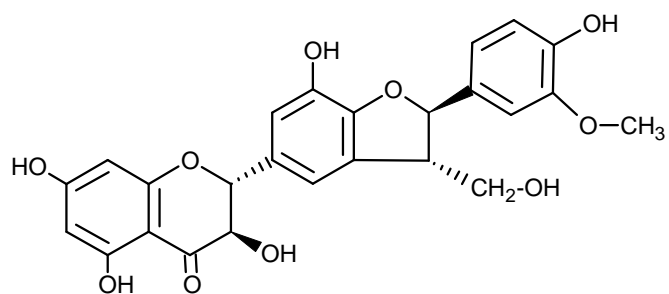
Systematický název silybinu A je (2*R*,3*R*)-2-[(2*R*,3*R*)-2,3-dihydro-3-(4-hydroxy-3-methoxyfenyl)-2-(hydroxymethyl)-1,4-benzodioxin-6-yl]-2,3-dihydro-3,5,7-trihydroxy-4*H*-1-benzopyran-4-on, *systematický název silybinu B* je (2*R*,3*R*)-2-[(2*S*,3*S*)-2,3-dihydro-3-(4-hydroxy-3-methoxyfenyl)-2-(hydroxymethyl)-1,4-benzodioxin-6-yl]-2,3-dihydro-3,5,7-trihydroxy-4*H*-1-benzopyran-4-on.



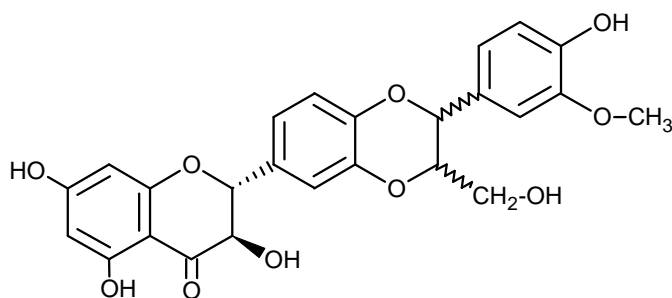
Obr. 2 – Přirozeně se vyskytující diastereomery silybinu



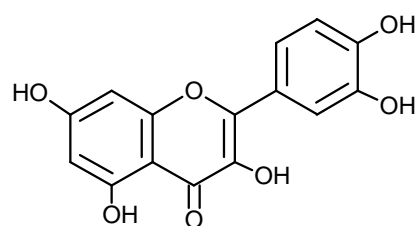
silydianin (2)



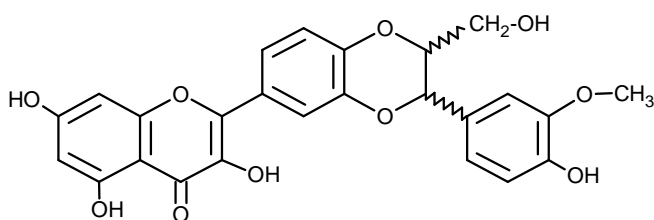
silychristin (3)



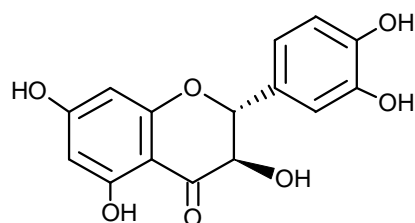
isosilybin (4)



kvercetin (6)



2,3-dehydrosilybin (5)



(+) - taxifolin (7)

Obr. 3 – Další flavonolignany a flavonoidy obsažené v silymarinu

2.2 Charakterizace flavonolignanů silymarinového komplexu

V roce 1952 Schinder [6, 7] a o dva roky později Herzog a Hagedorn [6, 8] prokázali flavonoidy ve zralých semenech ostropestřce. Janiak a Hänsel [6, 9] izolovali z ethylacetátového extraktu semen dvě fenolické látky, které pojmenovali E₅ a E₆. Sumární vzorce stanovili jako C₂₅H₂₄O₁₀ a C₂₆H₂₆O₁₀.

Wagner a kol.[6, 10] v roce 1965 izolovali z extraktu sloučeninu s molekulovým vzorcem C₂₅H₂₂O₁₀, u které bylo zjištěno, že je odpovědná za pozitivní farmakologické účinky. [6, 11, 12] Byla pojmenována silymarin nebo silybin. Tato sloučenina byla totožná s látkou E₆, kterou izolovali Janiak a Hänsel. [6, 9]

V roce 1968 Pelter a Hänsel [6, 13] na základě NMR a MS dat navrhli strukturu pro silymarin (silybin), která obsahovala benzodioxanovou vazbu, pocházející ze spojení taxifolinu a koniferylalkoholu. Struktura byla později potvrzena dalšími chemickými studiemi. [6, 14, 15]

Abraham a kol. [6, 16] izolovali z přečištěného acetonového extraktu ze semen ostropestřce izomer silybinu. Pojmenovali ho silydianin a byl identifikován jako sloučenina E₅.

Wagner a kol. [6, 17] izolovali z extraktu další sloučeninu, kterou pojmenovali silychristin. Wagner [6, 18] navrhl, aby se komplex flavonolignanů z ostropestřce mariánského nazýval silymarin a jeho hlavní složky silybin, silydianin a silychristin.

2.3 Průmyslová izolace silybinu

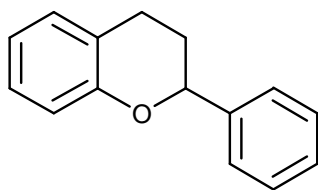
Olej ze semen ostropestřce mariánského se odstraní lisováním. Obsah oleje se sníží z 25 % přibližně na 8 %. Poté jsou semena extrahována acetonem, EtOH nebo MeOH. Extrakt se částečně odpaří a zbývající olej se odstraní extrakcí s hexanem. Surový silymarin se po dalším odpařování vysráží. Čistý silybin se připraví rozpuštěním silymarinu v absolutním EtOH, vysrážením s přídavkem vody a přečištěním rekrystalizací z EtOH. [19, 20]

2.4 Flavonoidy

Flavonoidy jsou rozsáhlou skupinou rostlinných fenolů odvozených od flavanu (**8**), který je tvořen dvěma benzenovými kruhy spojenými pyranem (Obr. 4). Strukturní variabilita přírodních flavonoidů je vysoká, obvykle se liší počtem a pozicí hydroxy a methoxy skupin. Rozeznáváme následující základní skupiny flavonoidů: flavany, flavanoly, flavony, flavonoly, anthokyanidiny, biflavanoidy a neoflavony (kumariny).

Přírodní flavonoidy se nejčastěji vyskytují ve formě *O*-glykosidů a lze je nalézt převážně v rostlinné říši. Nacházejí se v plodech, listech a květech mnoha rostlin (zelený a černý čaj, červené víno, ginkgo biloba), v různém ovoci (citrusy, jablka, jahody), zelenině (rajčata, česnek, cibule, špenát), zrnech (sója, proso), semenech (lněná semínka, kakaové boby) i koření (šalvěj, rozmarýn, pepř).

Mnoho flavonoidů vykazuje silnou antioxidační aktivitu. Jako typické sloučeniny fenolového charakteru mohou být deaktivátory volných radikálů a chelátory některých prooxidačních iontů kovů (Fe^{2+} , Fe^{3+} , Al^{3+} , Cu^{2+} , Mn^{2+}). Mohou potlačovat peroxidaci lipidů v řadě biologických systémů (mitochondrie), tvorbu superoxidového radikálu, oxidaci bílkovin, a to přímo anebo nepřímo, např. interakcí s některými enzymy. Antioxidační aktivita flavonoidů je závislá na počtu a poloze hydroxylových skupin v molekule, vliv má i jejich glykosylace. Flavonoidy snižují pravděpodobnost výskytu kardiovaskulárních chorob a nádorů, mají pozitivní vliv na neurologické nemoci. [21]



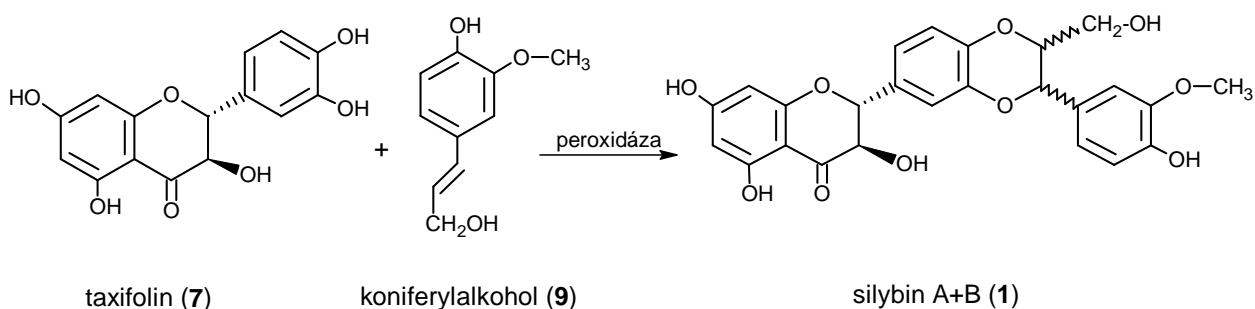
flavan (**8**)

Obr. 4 – Flavanový skelet

2.5 Silybin

Flavonolignan silybin je hlavní složkou komplexu přírodních flavonolignanů a polyfenolů silymarinu, který je aktivní látkou mnoha léčivých přípravků (Flavobion, Legalon či Ungolen).

Biosyntéza silybinu probíhá oxidativní radikálovou adicí koniferylalkoholu (9) na taxifolin (7), za katalýzy peroxidázou (Obr. 5). Reakce není stereospecifická, vzniká ekvimolární směs diastereomerů silybinu A a silybinu B (1) a další flavonolignany.



Obr. 5 – Biosyntéza flavonolignanů

Silybin má velice silné antioxidační, hepatoprotektivní, chemoprotektivní, a protinádorové účinky (především proti rakovině prostaty). Působí jako lapač volných radikálů, snižuje účinek jaterních jedů jako např. ethanol, tetrachlormethan či TI^+ . Má inhibiční účinek na různé oxygenasy a peroxidasy, používá se pro zlepšení funkce jater a při jaterních chorobách (žloutenka, mononukleosa, cirhóza). Silybin se váže na buněčné membrány a též proniká do buněčných jader, kde působí jako stimulátor syntézy proteinů, což umožňuje opravu poškozených buněčných struktur a náhradu poškozených enzymů. [1, 20]

Silybin je též používán jako antidotum při otravě muchomůrkou zelenou, protože při akutní otravě phalloidinem a α -amanitinem brání přítomnost silybinu navázání toxinů na buněčný povrch a aktivnímu transportu toxinů dovnitř jaterních buněk. [3]

Biologická dostupnost silybinu je limitována jeho nízkou rozpustností ve vodě (430 mg/l). Kvalitativní analýzy ukázaly, že silybin, bez ohledu na způsob podání, je vylučován močí převážně nezměněn, zatímco ve žluči jsou vylučovány jeho metabolity, které byly identifikovány jako glukuronidy a sulfáty silybinu a dehydrosilybinu. [6] Struktura ani biologická aktivita sulfátů není dosud známa.

2.6 Diastereomery a jejich dělení

Silybin je v silymarinu obsažen jako ekvimolární směs dvou diastereomerů A a B. [20] Diastereoizomerie je druh stereoizomerie (prostorové izomerie). Stereoizomery jsou látky, které se liší konfigurací alespoň na jednom centru chiralit. Diastereoizomery (dále diastereomery) se liší konfigurací na jednom nebo několika centrech. Enantiomery se pak liší konfigurací na všech chirálních centrech.

Diastereomery se odlišují různou optickou rotací i všemi ostatními fyzikálními vlastnostmi. Mají rozdílné body tání i varu, různou rozpustnost a jsou odlišně adsorbovány. Proto lze diastereomery většinou poměrně snadno dělit obvyklými metodami, nejčastěji krystalizací, destilací a chromatografií. [22]

V případě diastereomerů silybinu A a B je však jejich dělení komplikované (podobně jako např. u glukosy a galaktosy), nelze je oddělit krystalizačními metodami ani na základě rozpustnosti. Velmi špatně se od sebe dělí i chromatograficky pomocí HPLC. V minulosti byly vyvinuty chromatografické metody pro dělení silybinu A a B, ale jen v miligramových množstvích. [23]

Biologická aktivita těchto diastereomerů se výrazně liší (například silybin B je estrogeně aktivní, ale silybin A není), a je proto nutné vyvinout metodu pro získání opticky čistých diastereomerů pro biologické testování. [24, 25]

2.7 Princip preparativní RP-HPLC

Reversed phase – High Performance (Pressure) Liquid Chromatography = Vysokoučinná (vysokotlaká) kapalinová chromatografie na reverzní fázi.

Chromatografie je fyzikálně-chemická metoda dělení složek směsi na základě jejich distribuce mezi fází mobilní a stacionární. Reverzní systém znamená, že mobilní fáze je polární a stacionární fáze nepolární. Je tomu tedy opačně než u klasického uspořádání, např. na silikagelu. Hlavním požadavkem preparativní chromatografie je maximální výtěžek čisté látky za co nejkratší dobu. Používají se kolony dlouhé desítky centimetrů, průtoky v desítkách ml/min a většího objemu vzorku (až mililitry).

Nejčastěji používanou stacionární fází je na silikagelu chemicky vázaná oktadecylová fáze ($-C_{18}H_{37}$, zkráceně C18). Na této fázi lze v kombinaci s mobilní fází obsahující vodu nebo pufr a organický modifikátor separovat nepolární látky (např. PAU), látky polarizovatelné a slabé kyseliny a báze, jestliže se jejich disociace potlačí vhodnou úpravou pH.

Reverzní fáze patří mezi nejpoužívanější stacionární fáze v HPLC (cca 80 % všech aplikací). RP-HPLC má řadu výhod: nabídka fází je z hlediska selektivity široká, lze využít levné mobilní fáze, ustanovování rovnováhy v koloně je rychlé a metoda je celkově experimentálně jednoduchá. Reverzní fáze v kombinaci s vhodnými mobilními fázemi (voda s přídavkem organického modifikátoru - nižších alkoholů, acetonitrilu, tetrahydrofuranu, dioxanu, acetonu) umožňuje separaci analytu v biologických matricích.

Nevýhodou je, že stacionární fáze na bázi modifikovaného silikagelu jsou většinou stabilní jen v omezeném rozsahu pH (většinou 2,5 – 8,0).

Selektivitu reverzního systému lze ovlivnit nejen délkou alkylového řetězce: čím delší alkyl, tím vyšší retence nepolárních látek. Selektivita se většinou zvyšuje s rostoucím obsahem vody v mobilní fázi. Rozdělení píků lze snadno ovlivnit změnou mobilní fáze a částečně i průtokem nebo velikostí nástříku. Vzhledem k tomu, že pro detekci se nejčastěji používají kontinuální spektrofotometrické detektory, je důležité, aby mobilní fáze měla nízkou absorbanci při použité vlnové délce. [26, 27]

2.8 Současný stav problematiky

Martinelli a kolektiv [28] v roce 1991 popsali HPLC metodu pro dělení silybinu ze silymarinu za použití mobilní fáze o složení *n*-hexan/EtOH (70/30) okyselené 120 µl/l konc. H₃PO₄. Metoda však nedělí diastereomery silybinu a *n*-hexan je značně toxický.

Mascher a kol. [29] v roce 1993 publikovali analytickou HPLC metodu, která jako první dělila diastereomery silybinu. Tato metoda však využívala mobilní fázi složenou z 50 % methanolu a z 50 % 0,02 mol/l HClO₄, která není vhodná pro preparativní chromatografii.

V roce 1999 Kosina a Bartek [30] vyvinuli první prakticky použitelnou HPLC metodu pro analýzu silybinu v krevní plasmě. Diastereomery silybinu byly rovněž rozděleny. Použili k tomu kolonu se stacionární fází C18 a gradientovou eluci mobilních fází o složení A: MeOH/H₂O/CH₃COOH (37/63/0,5) a B: MeOH.

V roce 2002 Kvasnička a kol. [31] separovali a charakterizovali čtyři hlavní složky silymarinu (silybin, silychristin, silydianin a isosilybin) pomocí RP-HPLC se stacionární fází C18. Použili k tomu mobilní fázi o složení H₂O/MeOH/konc. H₃PO₄ (64/46/0,5) a UV detekci.

Kim a kol. [32] v roce 2003 kompletně separovali, izolovali a strukturně charakterizovali silybin A a B a isosilybin A a B. Jako první použili preparativní RP-HPLC metodu. Izolace diastereomerů dosáhli použitím gradientové eluce mobilní fáze složené z MeOH a H₂O.

V roce 2006 Lee a kol. [33] vyvinuli a aplikovali analytickou metodu pro identifikaci a charakterizaci všech aktivních komponent silymarinu, která se stala základem metod pro kontrolu kvality komerčního standardizovaného extraktu z ostropestřce a analýzy komponent silymarinu v plasmě. HPLC-MS metoda využívala kolony C18 a gradientové eluce za použití mobilní fáze složené ze složek A a B v poměru 60/40. A: CH₃COONH₄ okyselená HCOOH na pH 4, B: MeOH/H₂O/HCOOH (95/5/0,1).

O rok později Hoh a kol. [34] vyvinuli RP-HPLC metodu pro separaci silybinu, jeho diastereomerů a jeho metabolitů z krevní plasmy za použití kolony C18 a UV detektoru. Chromatografie byla gradientová, mobilní fáze A složená z H₂O a ledové CH₃COOH a mobilní fáze B z MeOH a ledové CH₃COOH.

Li a kol. [35] v roce 2007 zveřejnili LC-MS metodu vhodnou k preparativnímu separování diastereomerů silybinu a ke kvantitativnímu stanovení silybinu A a silybinu B v plasmě. K separaci použili preparativní kolonu 250x21 mm se stacionární fází C18. Mobilní fáze se skládala z MeOH/H₂O (45/55) a obsahovala 0,1 % HCOOH.

V roce 2009 Hadad a kol. [36] představili analytickou RP-LC metodu s UV detekcí vhodnou k separování všech aktivních komponent silymarinu. Použili monolitickou kolonu se stacionární fází C18 a mobilní fází skládající se z MeOH a 5 mmol/l NaH₂PO₄ (45/55) s upraveným pH na 2,75.

3 Experimentální část

3.1 Použité chemikálie

Voda (ultračistá), Watrex Ultrapur, San Francisco, USA

Methanol (p.a.), Penta, Chrudim, Česká republika

Acetonitril (gradient grade), Merck, Darmstadt, Německo

Dimethylsulfoxid (purum), Lachema, Brno, Česká republika

N,N-Dimethylformamid ($\geq 99,8\%$), Sigma-Aldrich, St. Louis, Montana, USA

Sulfur trioxide *N,N*-dimethylformamide complex ($\geq 97\%$), Sigma-Aldrich, St. Louis, Montana, USA

Sulfur trioxide triethylamine complex ($\geq 95\%$), Sigma-Aldrich, St. Louis, Montana, USA

Kyselina trifluoroctová (purum), Fluka, Buchs, Německo

Kyselina mravenčí ($\geq 85\%$), Merck, Darmstadt, Německo

Octan amonný (p.a.), Lachema, Brno, Česká republika

Amoniak (33%, čistý), Riedel-de Haën, Seelze, Německo

Silybin – dar Dr. Ladislava Cvaka, firma TAPI Galena, IVAX Pharmaceuticals, Opava,
Česká republika

Silybin-23-acetát – získán z laboratorních zásob [37], Praha, Česká republika

3.2 Použité přístroje

Měření bylo prováděno na kapalinovém chromatografu (Shimadzu, Kyoto, Japonsko) složeného z pumpy LC-8A, dávkovacího ventilu s 5ml smyčkou, dvoukanalového UV/VIS detektoru SPD-20A a sběračem frakcí FRC-10A. Akvizice a vyhodnocení dat byla provedena softwarem *LC Solution* (Shimadzu, Kyoto, Japonsko). K separaci byla použita preparativní kolona MAG 5 Labiospher PSI (Labio, Praha, Česká republika) s reverzní oktadecylovou fází C18, o rozměrech 25x250 mm, s velikostí částic 10 μm a náplní stabilní v rozmezí pH 2-9. Pro detekci byla použita vlnová délka 285 nm. Všechna měření byla prováděna při teplotě 22 °C.

K ověřování čistoty frakcí z preparativní RP-HPLC byl používán analytický kapalinový chromatograf (Spectra-Physics, Santa Clara, Kanada) s binární pumpou SP 8800, ventilem s 20 μl dávkovací smyčkou, skenovacím UV-VIS detektorem (Spectra Focus, Santa Clara, Kanada) a autosamplerem SP 8880. K separaci byla používána monolitická kolona Chromolith SpeedROD, RP-18e, 50x4,6 mm (Merck, Darmstadt, Německo).

Při práci v laboratoři byly dále používány následující přístroje: odparka (Heidolph, Schwabach, Německo), lyofilizátor Lyovac GT 2 (GEA, Copenhagen, Dánsko), váhy (Bel Engineering, Monza, Itálie), pipety (Eppendorf Research, Hamburk, Německo) a chemické nádoby (Simax, Sázava, Česká republika).

3.3 Příprava mobilních fází a vzorků

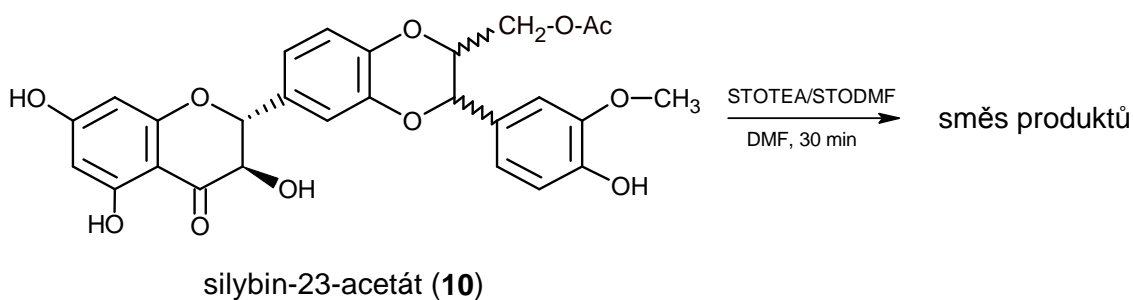
3.3.1 Příprava mobilních fází a silybinu na chromatografii

Methanol byl před použitím predestilován a přefiltrován přes mikrofiltr. Všechny mobilní fáze byly připravovány smícháním daných objemových poměrů – např. fáze o složení 60% methanolu se skládala z 60 objemových dílů methanolu a 40 objemových dílů vody (v/v).

Silybin byl bez dalších úprav rozpouštěn v DMSO. Takto připravený roztok silybinu byl přímo dávkován na kolonu 1000 μ l injekční stříkačkou (Hamilton, Bonaduz, Švýcarsko).

3.3.2 Obecný postup přípravy sulfátů silybin-23-acetátu

K výchozímu silybin-23-acetátu (**10**) rozpuštěnému v DMF (koncentrace 100 mg silybin-23-acetátu na 1 ml DMF) bylo přidáno sulfatační činidlo STOTEA nebo STODMF o stejné hmotnosti jako výchozí látka (Obr. 6). Reakční směs byla míchána 30 minut za laboratorní teploty 22 °C. Takto připravená směs různých sulfátů silybin-23-acetátu byla přímo dávkována na kolonu.



Obr. 6 – Reakce sulfatace silybin-23-acetátu

4 Výsledky a diskuze

4.1 Vyvinutí prakticky použitelné preparativní chromatografické metody pro dělení směsi diastereomerů silybinu

Separaci diastereomerů obecně ovlivňuje mnoho faktorů. Mezi nejdůležitější patří fyzikálně-chemická povaha diastereomerů a použité stacionární fáze, obsah organického modifikátoru, hodnota pH a průtok mobilní fáze. Dalšími proměnnými jsou množství analytu na koloně a její teplota. Pro separaci byla zvolena preparativní kolona MAG 5, 25x250 mm, s reverzní oktadecylovou fází.

Cílem této práce bylo nalezení přijatelného kompromisu z hlediska trvání analýzy a čistoty získaných látek.

Jak je patrné z oddílu 2.8, při separacích diastereomerů silybinu byly v publikovaných pracích [32, 33, 35] jako organické modifikátory použity MeOH i ACN a většina separací byla provedena v kyselém prostředí (HCOOH, TFA). Z tohoto důvodu jsme se snažili nalézt vhodnou mobilní fázi s obsahem methanolu.

Závislost retence a dělení diastereomerů silybinu na obsahu MeOH v mobilní fázi byla proměřena v rozmezí 45-60 % (v/v), s krokem 5 % obsahu methanolu (Tab. 1). Všechna měření byla prováděna při průtokové rychlosti mobilní fáze 13 ml/min a tlaku ~ 6 MPa.

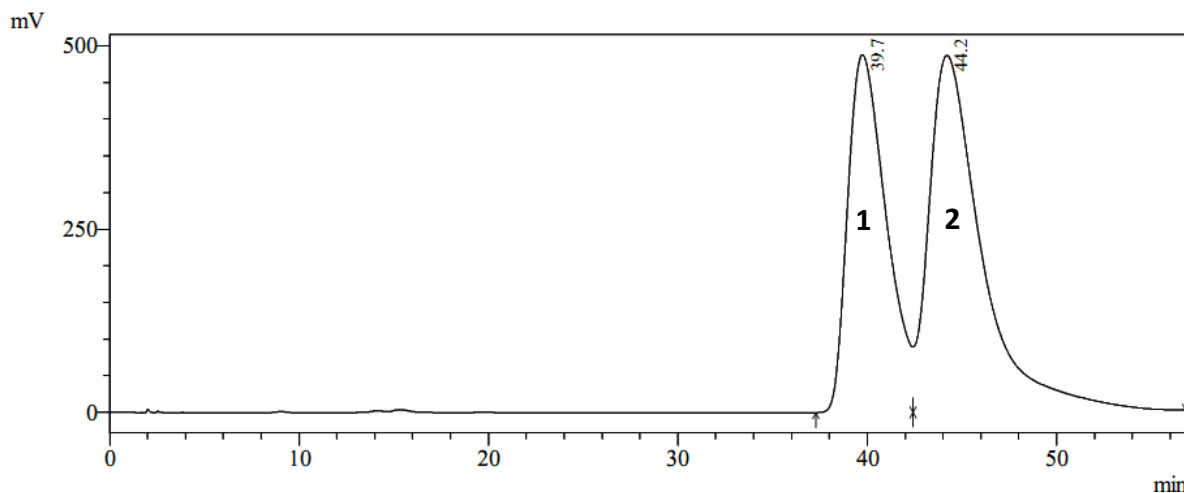
Potvrzení čistoty píků bylo provedeno pomocí analytické HPLC (viz oddíl 4.2).

Tab. 1 – Vliv složení mobilní fáze na retenční čas silybinu A

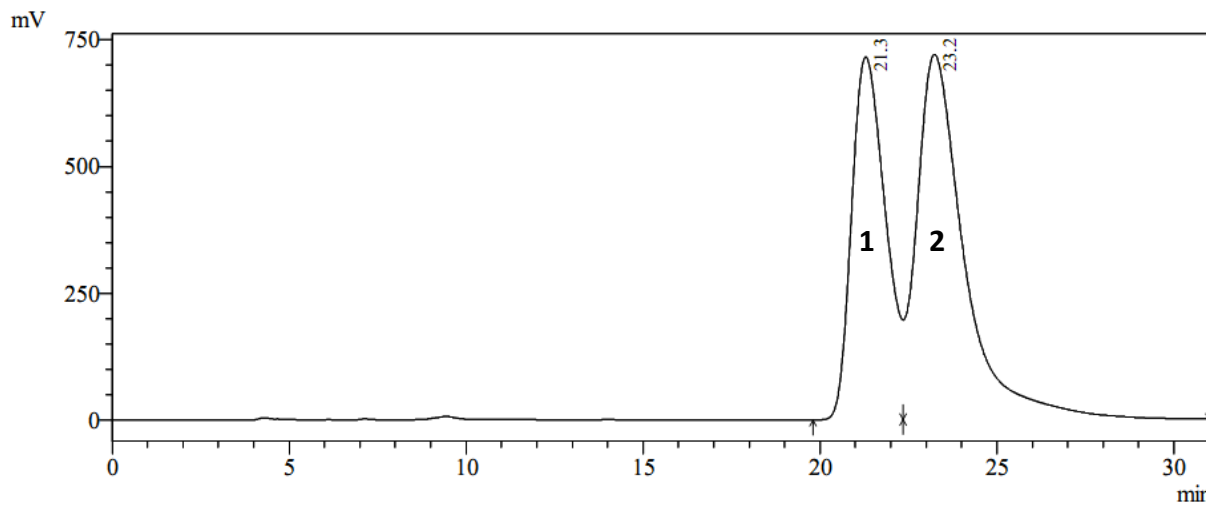
Mobilní fáze MeOH/H ₂ O	Retenční čas silybinu A (min)
45/55	39,7
50/50	21,3
55/45	12,4
60/40	8,6

Separace v mobilních fázích s vyšším podílem MeOH (nad 55 %) neposkytly dostatečné rozlišení diastereomerů silybinu (Obr. 9). Rozlišení píků se podařilo zlepšit snížením podílu MeOH v m.f. na 45 %. Zároveň se tím ale prodloužila doba analýzy až na 40 minut (Obr. 7) a došlo k výraznému snížení množství získaných diastereomerů za časovou

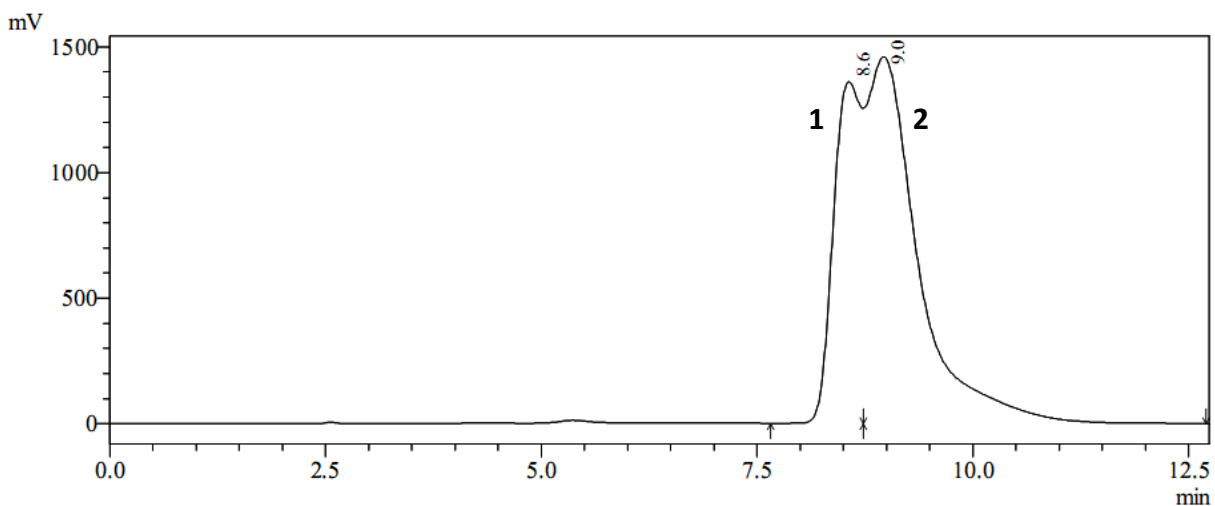
jednotku. Jako optimální byla zvolena mobilní fáze s akceptovatelným dělením diastereomerů silybinu a retenčním časem 20 minut o složení MeOH/H₂O 50/50 (v/v) (Obr. 8).



Obr. 7 – Chromatogram dělení diastereomerů silybinu při složení m.f. MeOH/H₂O 45/55 (v/v), detekce $\lambda = 285$ nm, průtoková rychlost 13 ml/min. Analyty: 1 – silybin A, 2 – silybin B. Nástřik 30 mg silybinu.

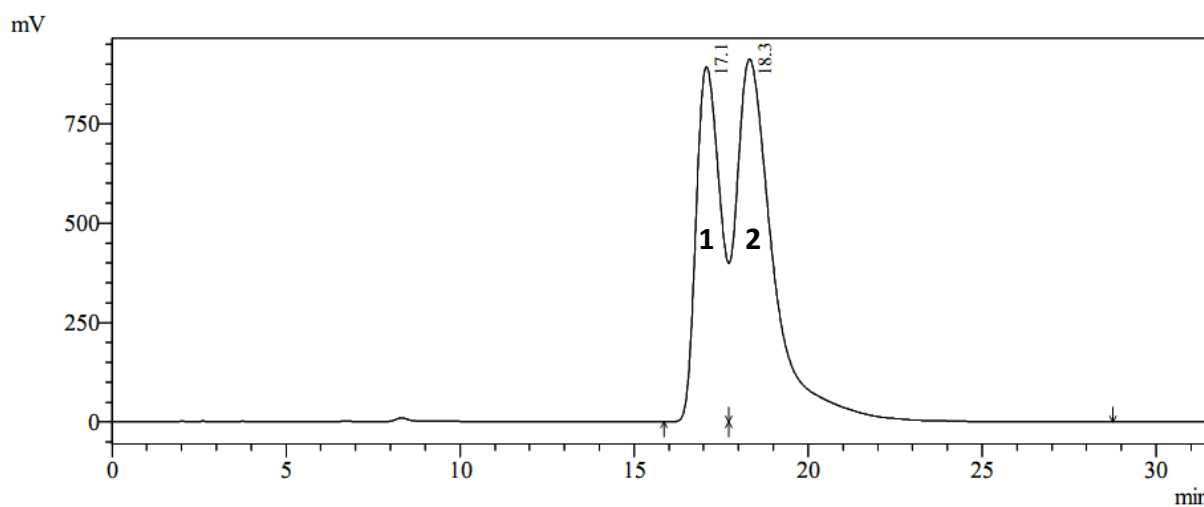


Obr. 8 – Chromatogram dělení diastereomerů silybinu při složení m.f. MeOH/H₂O 50/50 (v/v), detekce $\lambda = 285$ nm, průtoková rychlost 13 ml/min. Analyty: 1 – silybin A, 2 – silybin B. Nástřik 35 mg silybinu.



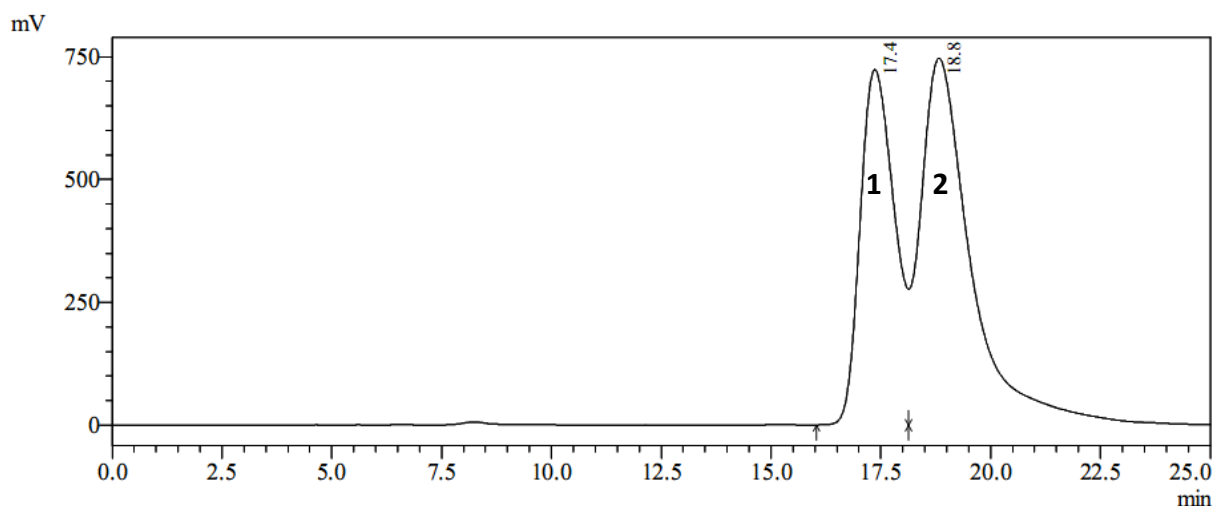
Obr. 9 – Chromatogram dělení diastereomerů silybinu při složení m.f. MeOH/H₂O 60/40 (v/v), detekce $\lambda = 285$ nm, průtoková rychlost 13 ml/min Analyty: 1 – silybin A, 2 – silybin B. Nástřik 42 mg silybinu.

Dále byla otestována mobilní fáze MeOH/ACN/H₂O 40/10/50 (v/v/v). Retenční čas se sice oproti mobilní fázi MeOH/H₂O 50/50 (v/v) snížil o 3 minuty, ale zhoršilo se dělení diastereomerů silybinu, což je zřejmé z Obr. 10.



Obr. 10 – Chromatogram dělení diastereomerů silybinu při složení m.f. MeOH/ACN/H₂O 40/10/50 (v/v/v), detekce $\lambda = 285$ nm, průtoková rychlost 13 ml/min. Analyty: 1 – silybin A, 2 – silybin B. Nástřik 38 mg silybinu.

Nakonec byl studován vliv okyselení mobilní fáze na separaci diastereomerů silybinu. Přídavkem 0,1 % TFA bylo sníženo pH mobilní fáze. Retenční čas se zkrátil o 3,5 minuty oproti mobilní fázi MeOH/H₂O 50/50 (v/v), avšak dělení diastereomerů silybinu zůstalo nezměněno, jak je patrné z Obr. 11. Z tohoto důvodu bylo od okyselování mobilní fáze upuštěno, protože rezidua kyselin se následně špatně odstraňují z čistých preparátů.

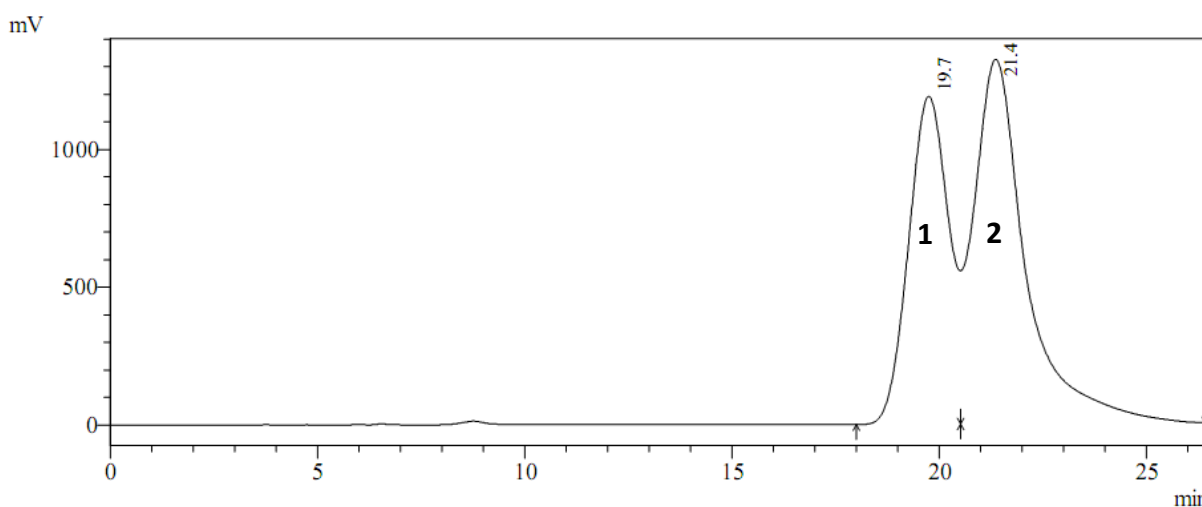


Obr. 11 – Chromatogram dělení diastereomerů silybinu při složení m.f. MeOH/H₂O 50/50 (v/v), s přídavkem 0,1 % TFA (1 ml/l), detekce $\lambda = 285$ nm, průtoková rychlost 13 ml/min. Analyty: 1 – silybin A, 2 – silybin B. Nástřik 35 mg silybinu.

Optimální podmínky pro separaci diastereomerů silybinu na koloně MAG 5, C18, jsou tyto: mobilní fáze MeOH/H₂O 50/50 (v/v), průtoková rychlost 13 ml/min, UV detekce při 285 nm. Tyto podmínky sice nezaručily úplné rozdělení diastereomerů, ale pro preparativní chromatografii jsou dostačující.

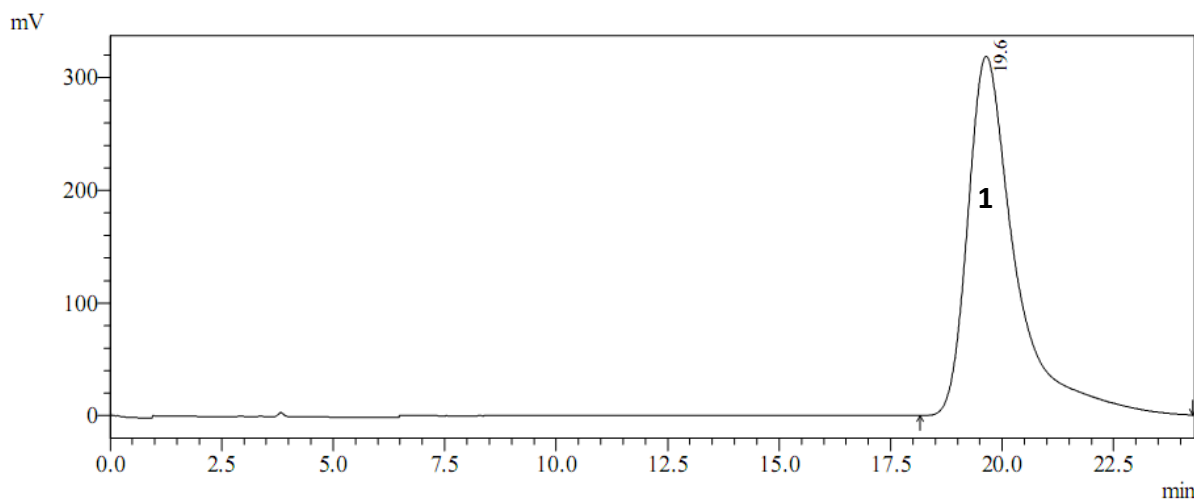
4.2 Získání čistých diastereomerů silybinu A a silybinu B

Vyvinutá chromatografická separační metoda byla otestována při preparaci čistých diastereomerů silybinu A a silybinu B. Dělení diastereomerů silybinu bylo prováděno v m.f. o složení MeOH/H₂O 50/50 (v/v) a průtoku 13 ml/min. 40 mg silybinu bylo rozpuštěno v 200 µl DMSO a nadávkováno na kolonu. Sběračem frakcí byly jímány frakce silybinu A a silybinu B (Obr. 12).

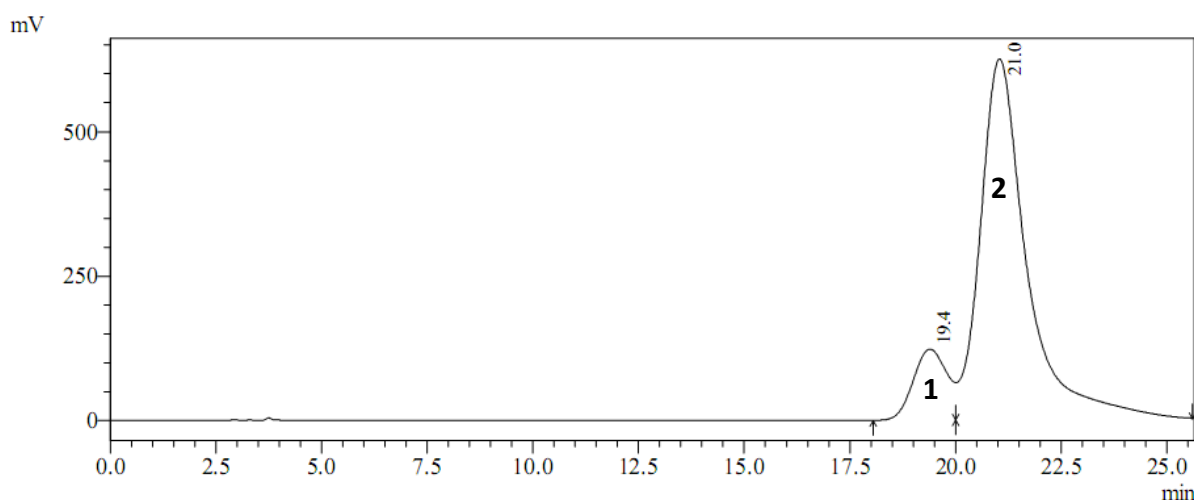


Obr. 12 – Chromatogram dělení diastereomerů při složení m.f. MeOH/H₂O 50/50 (v/v), detekce $\lambda = 285 \text{ nm}$, průtoková rychlost 13 ml/min. Analyty: 1 – silybin A, 2 – silybin B. Nástřik 40 mg silybinu.

Frakce silybinu A a silybinu B byly následně odpařeny do sucha, zváženy, rozpuštěny v 100 µl DMSO a opět nadávkovány na kolonu. Sběrač frakcí opět sbíral frakce silybinu A a silybinu B, jak je vidět na Obr. 13 (pro frakci silybinu A) a Obr. 14 (pro frakci silybinu B). Z chromatogramů je patrné, že první frakce obsahovala pouze čistý silybin A, druhá frakce silybinu B byla znečištěna silybinem A.



Obr. 13 – Chromatogram dělení diastereomerů silybinu po opakovaném nástřiku frakce silybinu A při složení m.f. MeOH/H₂O 50/50 (v/v), detekce $\lambda = 285$ nm, průtoková rychlost 13 ml/min. Analyty: 1 – silybin A. Nástřik 18 mg frakce silybinu A v 0,1 ml DMSO.



Obr. 14 – Chromatogram dělení diastereomerů silybinu po opakovaném nástřiku frakce silybinu B při složení m.f. MeOH/H₂O 50/50 (v/v), detekce $\lambda = 285$ nm, průtoková rychlost 13 ml/min. Analyty: 1 – silybin A, 2 – silybin B. Nástřik 22 mg frakce silybinu B v 0,1 ml DMSO.

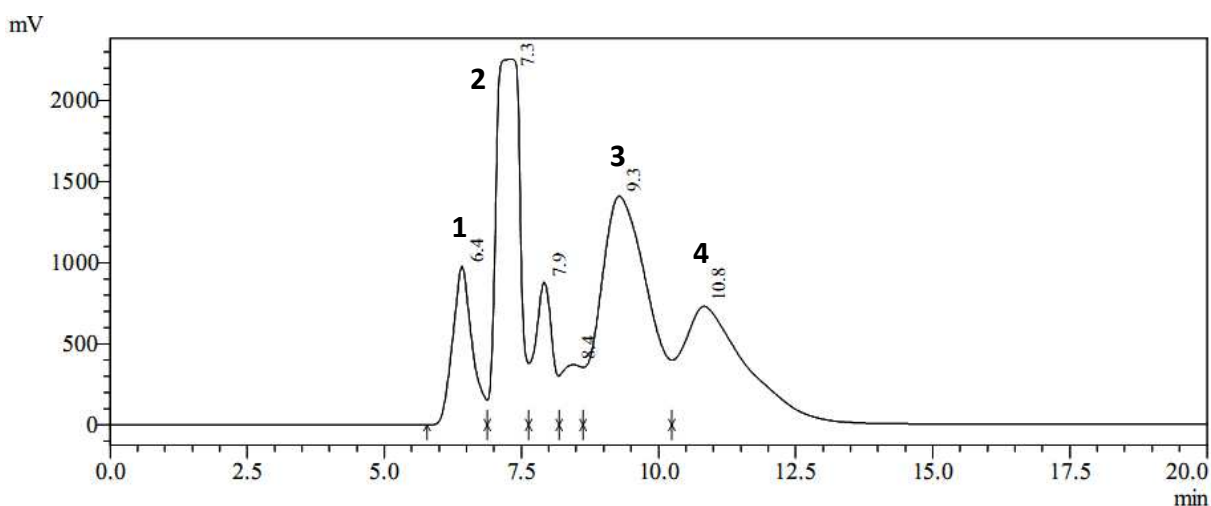
Přečištěné frakce byly opět odpařeny a zváženy. Čistota jednotlivých diastereomerů silybinu byla zjištěna pomocí analytické HPLC při izokratickém módu mobilní fáze složené z 20 ml ACN, 370 ml MeOH, 610 ml H₂O a 1 ml TFA, o průtoku 1,5 ml/min. Chromatogramy z analytické HPLC jsou uvedeny v příloze A.

Bylo získáno 15 mg silybinu A o diastereomerním nadbytku (d.e.) 99 % a 18 mg silybinu B o d.e. 92 %. Pokud by se na koloně separovalo více nástřiků roztoku silybinu v DMSO přes sebe, bylo by za jeden den možno získat až 200 mg silybinu A a 200 mg silybinu B.

4.3 Chromatografické dělení reakční směsi po sulfataci silybin-23-acetátu

Dalším cílem práce bylo optimalizování preparativní chromatografické metody pro dělení sulfátů silybin-23-acetátu z reakční směsi. Reakční směs byla připravena postupem popsaným v oddílu 3.3.2 a byla přímo dávkována na kolonu. Jako mobilní fáze byla používána směs MeOH/H₂O 60/40 (v/v). Úkolem bylo nalézt vhodné aditivum, které by zaručilo dobré rozdělení jednotlivých píků.

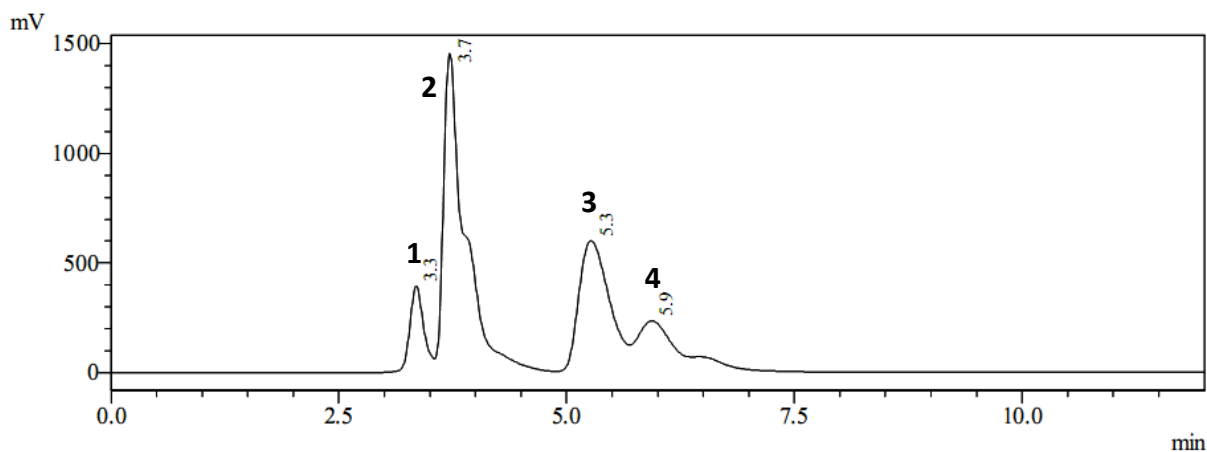
Nejprve byla do mobilní fáze přidána jako aditivum 0,1 % TFA (1 ml/l) a došlo k vyostření jednotlivých píků (Obr. 15). Přídavek TFA retenční časy neovlivnil.



Obr. 15 – Chromatogram dělení reakční směsi po sulfataci silybin-23-acetátu při složení m.f. MeOH/H₂O 60/40 (v/v) s přídavkem 0,1 % TFA (1ml/l), detekce $\lambda = 285$ nm, průtoková rychlost 13 ml/min. Nástřik 450 μ l reakční směsi.

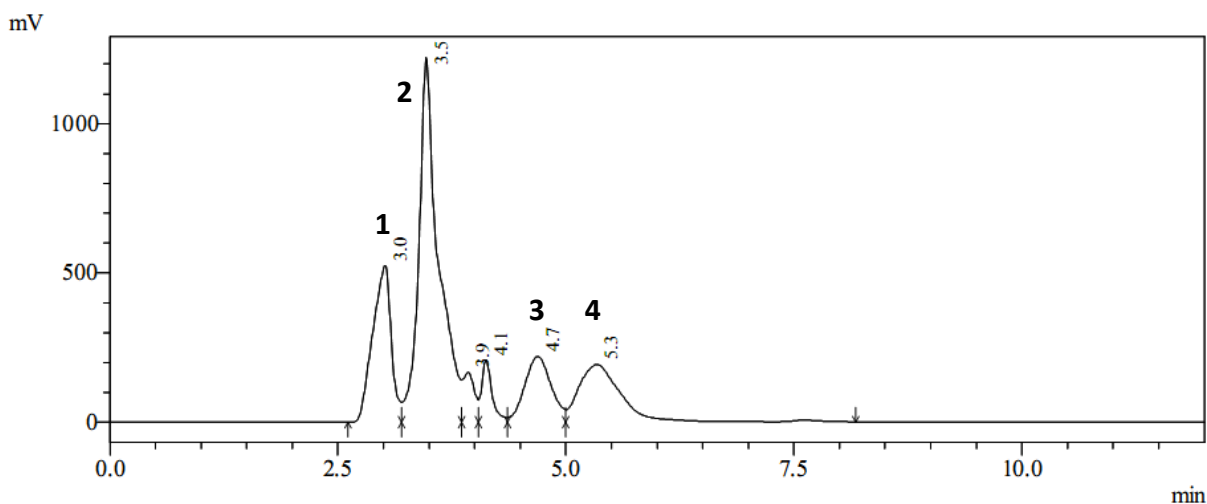
TFA je silná ($pK_a = 0,6$) a toxická kyselina. Bylo zjištěno, že k okyselování mobilní fáze byla pro daný účel nevhodná. Vlivem výrazného snížení pH během odpařování nasbíraných frakcí docházelo k rozkladu analytů na komplikovanou směs sloučenin, která nebyla dále zkoumána. Rozklad produktů byl omezen neutralizací kyseliny v mobilní fázi pomocí vodného roztoku amoniaku na pH ~ 7 ještě před odpařením frakcí. Vzniklý trifluoracetát amonný však vzorky kontaminoval a jeho odstranění by bylo velmi komplikované.

Jako druhá byla testována mobilní fáze MeOH/H₂O 60/40 (v/v) s přidavkem octanu amonného (4 g/l, c = 50 mmol/l) (Obr. 16). V tomto případě docházelo při odpařování pouze k částečnému rozkladu produktů. Vzhledem k tomu, že produkty nebylo možné získat v dostatečné čistotě a navíc se ukázalo, že odstraňování octanu amonného lyofilizací je velmi časově náročné, bylo od této metody upuštěno.



Obr. 16 – Chromatogram dělení reakční směsi po sulfataci silybin-23-acetátu při složení m.f. MeOH/H₂O 60/40 (v/v) s přidavkem CH₃COONH₄ (4 g/l), detekce $\lambda = 285$ nm, průtoková rychlost 13 ml/min. Nástřik 300 μ l reakční směsi.

Poslední testovanou mobilní fází byla směs MeOH/H₂O 60/40 (v/v) s přidavkem HCOOH (pK_a = 3,7). Kyseliny mravenčí bylo přidáváno 10 ml na 1 l mobilní fáze (1 %). Reakční směs sulfatace silybin-23-acetátu vykazovala v této mobilní fázi velmi dobré dělení, jak je vidět na Obr. 17.

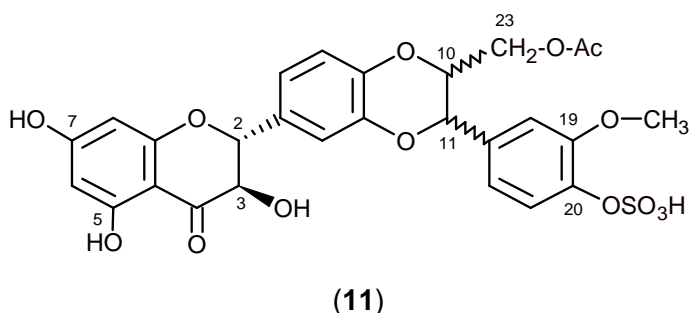


Obr. 17 – Chromatogram dělení reakční směsi po sulfataci silybin-23-acetátu při složení m.f. MeOH/H₂O 60/40 (v/v) s přidavkem 1 % HCOOH (10 ml/l), detekce $\lambda = 285$ nm, průtoková rychlost 13 ml/min. Nástřik 250 μ l reakční směsi.

Sběračem frakcí byly získány celkem čtyři frakce. Signály 1 a 2 nevykazovaly UV spektrum silybinu (UV spektrum silybinu je uvedeno v příloze B), a proto nebyly dále analyzovány. Pravděpodobně se jedná o eluci DMSO (první signál) a rozpadové produkty sulfatačního komplexu či produkty degradace silybinu (druhý signál).

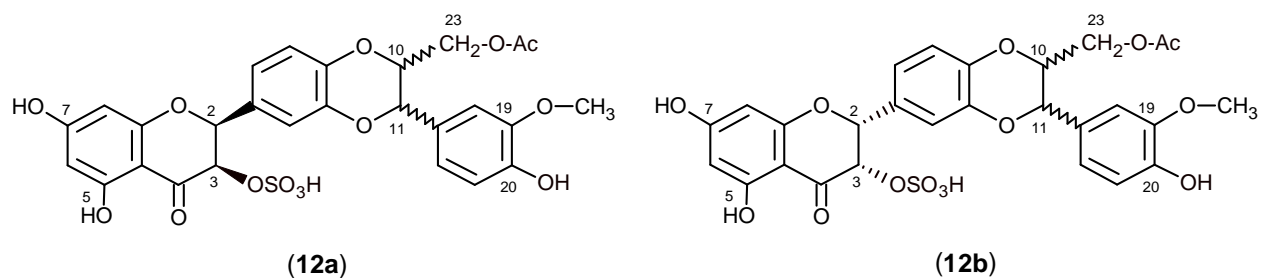
Kyselina mravenčí obsažená v eluované mobilní fázi byla ihned po získání jednotlivých frakcí zneutralizována vodným roztokem amoniaku na pH ~ 7 a roztok byl na vakuové odparce zahuštěn na polovinu objemu. Vzniklý mravenčan amonný byl z vodného roztoku odstraněn lyofilizací.

Pomocí NMR spektroskopie byl 3. pík předběžně identifikován jako silybin-23-acetát-20-sulfát (**11**) (Obr. 18).



Obr. 18 – Předběžně určená struktura třetího eluentu

4. pík byl identifikován jako silybin-23-acetát-3-sulfát (**12a**) nebo (**12b**) (Obr. 19), s *cis*- konfigurací v polohách 2 a 3. Absolutní konfiguraci sulfátu (**12a-b**) se zatím nepodařilo určit.



Obr. 19 – Struktura čtvrtého eluentu

5 Závěr

V této bakalářské práci byla vyvinuta metoda preparativní vysokoúčinné kapalinové chromatografie pro separaci diastereomerů silybinu, které jsou obsaženy jako ekvimolární směs ve standardizovaném extraktu z ostropestřce mariánského – silymarinu.

Byla optimalizována preparativní chromatografická metoda pro separaci sulfátů silybin-23-acetátu z reakční směsi vznikající při sulfataci silybin-23-acetátu.

Měření byla prováděna na separační preparativní koloně MAG 5, 25x250 mm, s reverzní oktadecylovou fází. Byl studován vliv organických modifikátorů (MeOH a ACN) a okyselení mobilní fáze na separaci analytů.

Jako optimální složení mobilní fáze pro preparativní separaci diastereomerů silybinu byl nalezen poměr organický modifikátor – vodná fáze: MeOH/H₂O 50/50 (v/v), průtoková rychlost 13 ml/min a UV detekce při 285 nm. Metoda byla otestována na reálném vzorku silybinu a bylo získáno 15 mg silybinu A o diastereomerním nadbytku 99 % a 18 mg silybinu B o d.e. 92 %. Za den by bylo možno získat až 200 mg silybinu A a 200 mg silybinu B.

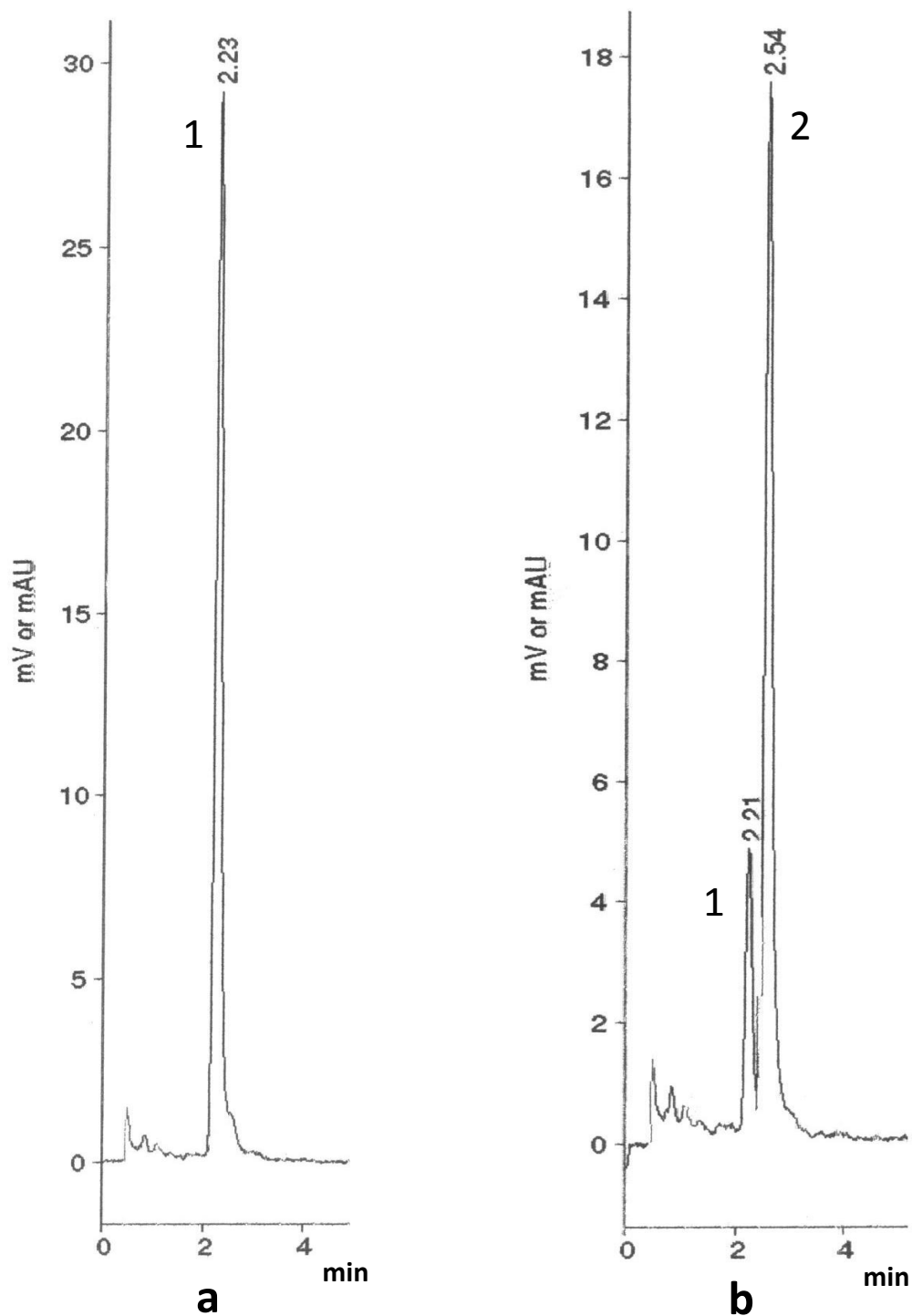
Jako optimální aditivum pro mobilní fázi o složení MeOH/H₂O 60/40 (v/v) pro preparativní separaci sulfátů silybin-23-acetátu z reakční směsi sulfatace silybin-23-acetátu byl nalezen přídavek 1 % HCOOH (10 ml/l). Průtoková rychlost byla 13 ml/min a UV detekce při 285 nm. Kyselina mravenčí obsažená v mobilní fázi byla ihned po separaci zneutralizována vodným roztokem amoniaku.

Při separaci reakční směsi nedocházelo k diastereomernímu dělení sulfátů silybin-23-acetátu. Do budoucna by bylo možno tento problém efektivně vyřešit využitím opticky čistých diastereomerů silybinu jako výchozí materiál pro přípravu silybin-23-acetátu A a B a dále pak pro získání opticky čistých diastereomerů sulfátů silybin-23-acetátu A a B.

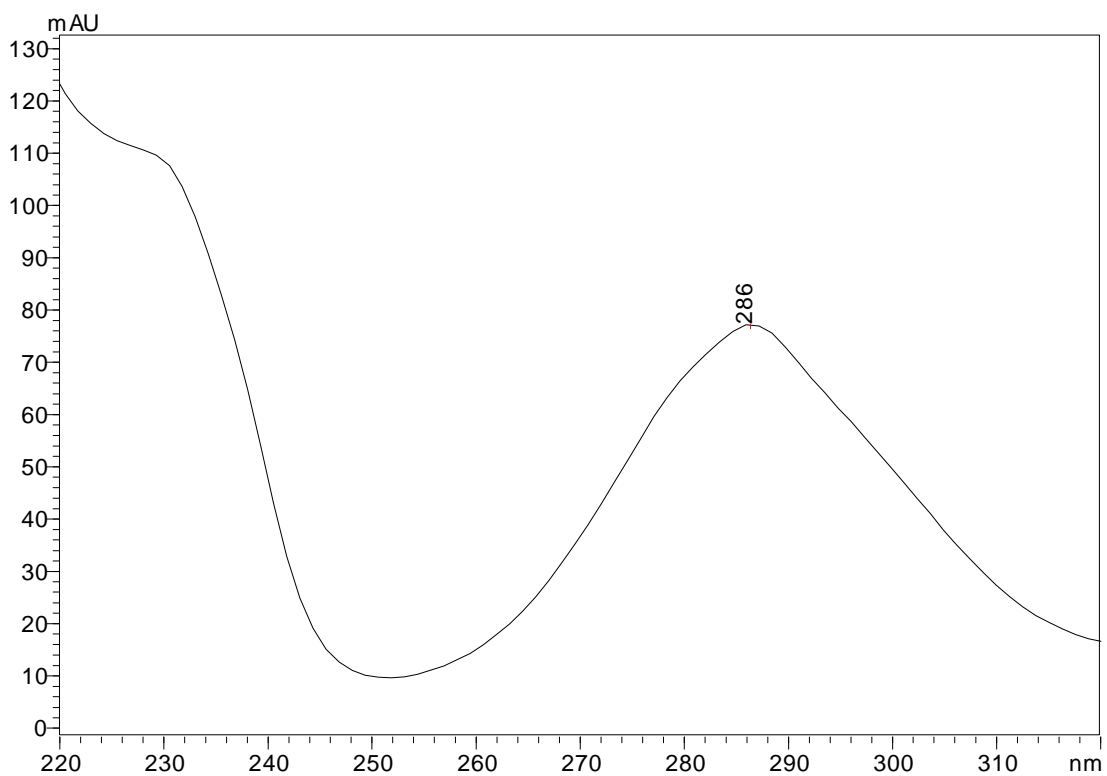
Literatura

- [1] Jegorov A.: Chem. Listy 90, 859 (1996).
- [2] Grau J., Jung R., Munker B.: *Bobulovité, užitkové a léčivé rostliny*, str. 196. Ikar, Praha 1996.
- [3] Slavík B., Štěpánková J., Štěpánek J., Křísa B.: *Květena české republiky* 7, str. 422. Academia, Praha 2004.
- [4] Korbelař E.: *Naše rostliny v lékařství*, str. 306. Avicentrum, sedmé vydání, Praha 1981.
- [5] Váňa P.: *Rady bylináře Pavla*, str. 29. ÁKA Čejkovo nakladatelství, Praha 1990.
- [6] Morazzoni P., Bombardelli E.: *Fitoterapia* 66, 3 (1995).
- [7] Schindler H.: *Arzneim. Forsch.* 2, 295 (1952).
- [8] Herzog M., Hagedorn P.: *Dtsch. Apoth. Ztg.* 94, 1175 (1954).
- [9] Janiak B., Hänsel R.: *Planta Med.* 8, 71 (1960).
- [10] Wagner H., Hörhammer L., Münster R.: *Naturwiss.* 52, 305 (1965).
- [11] Wagner H., Hörhammer L., Münster R.: *Arzneim. Forsch.* 18, 688 (1968).
- [12] Wagner H., Hörhammer L., Seitz M.: *Arzneim. Forsch.* 18, 696 (1968).
- [13] Pelter A., Hänsel R.: *Tetrahedron Lett.* 25, 2911 (1968).
- [14] Hänsel R., Schulz J., Pelter A., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1, 195 (1972).
- [15] Pelter A., Hänsel R.: *Chem. Ber.* 108, 790 (1975).
- [16] Abraham D. J., Takagi S., Rosenstein R. D., Shiono R., Wagner H., Hörhammer L., Seligmann O., Farnsworth N. R.: *Tetrahedron Lett.* 31, 2675 (1970).
- [17] Wagner H., Seligmann O., Hörhammer L., Seitz M., Sonnenbichler J.: *Tetrahedron Lett.* 22, 1895 (1971).
- [18] Hänsel R., Kaloga M., Pelter A.: *Tetrahedron Lett.* 26, 2241 (1976).
- [19] Osobní sdělení: Dr. L. Cvak, IVAX Pharmaceuticals, Opava
- [20] Gažák R., Walterová D., Křen V.: *Curr. Med. Chem.* 14, 315 (2007).
- [21] Volf K., Andrs F.: *Flavonoidy a jejich biologické působení*, JuWital s.r.o., Praha 2008.
- [22] Potapov V. M.: *Stereochemie*, SNTL, Praha 1986.
- [23] Graf T. N., Wani M. C., Agarwal R., Kroll D. J., Oberlies N.H.: *Planta Med.* 14, 1495 (2007).
- [24] Plíšková M., Vondráček J., Křen V., Gažák R., Sedmera P., Walterová D., Psotová J., Šimánek V., Machala M.: *Toxicology* 215, 80 (2005).
- [25] Davis-Searles P.R., Nakanishi Y., Kim N. Ch., Graf T.N., Oberlies N. H., Wani M. C., Wall M. E., Agarwal R., Kroll D. J.: *Cancer Res.* 65, 4448 (2005).
- [26] Štulík K., et al.: *Analytické separační metody*, Karolinum, Praha 2004.
- [27] Churáček J., Jandera P.: *Úvod do vysokoúčinné kapalinové chromatografie*, SNTL, Praha 1984.
- [28] Martinelli E. M., Morazzoni P., Livio S., Uberti E.: *J. Liq. Chromatogr.* 14, 1285 (1991).
- [29] Mascher H., Kikuta C., Weyhenmeyer R.: *J. Liq. Chromatogr.* 16, 2777 (1993).

- [30] Kosina P., Bartek J.: *Chem. Listy* 94, 1115 (2000).
- [31] Kvasnička F., Bíba B., Ševčík R., Voldřich M., Krátká J.: *J. Chromatogr. A* 990, 239 (2003).
- [32] Kim N. Ch., Graf T. N., Sparacino Ch. M., Wani M. C., Wall M. E.: *Org. Biomol. Chem.* 1, 1684 (2003).
- [33] Lee J. I., Hsu B. H., Wu D., Barrett J. S.: *J. Chromatogr. A* 1116, 57 (2006).
- [34] Hoh C. S. L., Boocock D. J., Marczylo T. H., Brown V. A., Cai H., Steward W. P., Berry D. P., Gescher A. J.: *J. Agric. Food Chem.* 55, 2532 (2007).
- [35] Li W., Han J., Li Z., Li X., Zhou S., Liu Ch.: *J. Chromatogr. B* 862, 51 (2008).
- [36] Hadad G. M., Emara S., Abdel-Salam R. A.: *Chromatographia* 70, 217 (2009).
- [37] Gažák R.: *Dizertační práce. Vysoká škola technologická, Praha 2006.*



Příloha A – Chromatogramy dělení diastereomerů silybinu z analytické HPLC: **(a)** - frakce silybinu A po druhé separaci, čistota d.e. 99 %, **(b)** - frakce silybinu B po druhé separaci, čistota d.e. 92 %. Izokratický mód mobilní fáze o složení: 20 ml ACN, 370 ml MeOH, 610 ml H₂O a 1 ml TFA, detekce $\lambda = 285$ nm, průtoková rychlost 1,5 ml/min. Analyty: 1 – silybin A, 2 – silybin B.



Příloha B – UV spektrum silybinu z analytické HPLC, izokratický mód mobilní fáze o složení: 20 ml ACN, 370 ml MeOH, 610 ml H₂O a 1 ml TFA.