

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Analytická chemie



Bc. Petra Kolářová

HPLC STANOVENÍ DIASTEREOISOMERŮ
SILYBINU V PLAZMĚ LABORATORNÍCH ZVÍŘAT

HPLC Determination of Silybin Diastereoisomers
in Plasma of Laboratory Animals

Diplomová práce

Školitel diplomové práce: prof. RNDr. Eva Tesařová, CSc.

Konzultanti diplomové práce: Ing. Petr Marhol

prof. Ing. Vladimír Křen, DrSc.

prof. RNDr. Jiří Barek, CSc.

Praha 2012

Tato diplomová práce vznikla za podpory grantu GAČR P301/11/0767.

Práce byla vypracována v Laboratoři biotransformací Mikrobiologického ústavu Akademie věd České republiky v Praze, od září 2010 do května 2012.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně, pod vedením prof. RNDr. Evy Tesařové, CSc.; prof. RNDr. Jiřího Barka, CSc.; Ing. Petra Marhola a prof. Ing. Vladimíra Křena, DrSc.

Dále prohlašuji, že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 1. května 2012.

Podpis

Poděkování

Na tomto místě bych ráda vyjádřila svůj dík všem lidem, kteří přispěli k realizaci této diplomové práce.

Ráda bych poděkovala své školitelce prof. RNDr. Evě Tesařové, CSc. za zadání tématu a za příležitost pracovat pod jejím laskavým vedením po celou dobu vysokoškolského studia.

Dále děkuji konzultantům Ing. Petrovi Marholovi, prof. Ing. Vladimíru Křenovi, DrSc. a prof. RNDr. Jiřímu Barkovi, CSc. za cenné praktické i teoretické rady.

Současně bych ráda poděkovala všem pracovníkům Laboratoře biotransformací MBÚ AV ČR, v.v.i., za ochotu a pomoc při práci na zadaném úkolu, zejména Mgr. Kateřině Purchartové a Mgr. Evě Vavříkové, PhD. Dále děkuji RNDr. Davidu Biedermannovi, PhD. a Ing. Lence Weignerové, PhD. za cenné podněty a připomínky. Prof. Křenovi velmi děkuji za umožnění práce v jeho skupině.

Můj dík patří rovněž i prof. RNDr. Jitce Ulrichové CSc. a Doc. MUDr. Rostislavu Večeřovi PhD. z Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci za zrealizování klinické *in vivo* studie.

Zvláštní dík patří mé rodině za umožnění studia, za nekonečnou trpělivost, pochopení a za psychickou podporu při studiu.

Klíčová slova: silybin
HPLC
metabolity
plazma

Key words: silybin
HPLC
metabolites
plasma

Abstrakt

Silybin je hlavní složkou silymarinu, což je standardizovaný extrakt získaný z plodů ostropestřce mariánského (*Silybum marianum*). Flavonolignan silybin má antioxidační, hepatoprotektivní, chemoprotektivní a protinádorovou aktivitu. Přírodní silybin se vyskytuje jako téměř ekvimolární směs dvou diastereoisomerů - silybinu A a silybinu B, jejichž analytické oddělení je možné, avšak preparativní separace je komplikovaná.

Biologická aktivita silybinu A je odlišná od silybinu B. Bylo prokázáno, že diastereoisomery silybinu se v organismu konjugují převážně na glukuronidy a sulfáty.

Ve většině dosavadních biologických, farmakokinetických a chemických studiích byla použita směs obou diastereoisomerů silybinu. V této diplomové práci byl pro farmakokinetickou studii poprvé separátně využit opticky čistý silybin A a silybin B. Předmětem práce bylo zjištění koncentrace volného a celkového silybinu v plazmě potkanů v závislosti na čase od podání dávky silybinu A nebo B.

Teoretický úvod popisuje současný stav problematiky chemie, farmakologie a farmakokinetiky diastereoisomerů silybinu. Druhá část je zaměřena na výběr vhodné analytické kolony, vypracování chromatografické metody a vhodného postupu úpravy biologických vzorků pro stanovení diastereoisomerů silybinu. Poslední část se zabývá stanovením volného a celkového silybinu A a B v plazmě laboratorních zvířat.

Naše výsledky jasně prokázaly, že v metabolismu silybinu má významnou roli stereoselektivita. Silybin B se konjugoval rychleji a ve větším rozsahu než silybin A. Množství volného silybinu A bylo v celém časovém rozsahu průměrně 18 % z celkového množství silybinu A v plazmě, zatímco volného silybinu B bylo průměrně pouze 8 %.

Oddělené intragastrické dávkování opticky čistých diastereoisomerů silybinu potkanům mělo zásadní vliv na posun maxim hmotnostních koncentrací.

Abstract

Silybin is the main component of silymarin, a standardized extract obtained from the seeds of milk thistle (*Silybum marianum*). Flavonolignan silybin has antioxidant, hepatoprotective, chemoprotective and antitumor activities. Natural silybin occurs as an approximately equimolar mixture of two diastereoisomers - silybin A and silybin B. Analytical separation of these diastereoisomers is possible but preparative separation is complicated.

The biological activity of the silybin A is different from the silybin B. Silybin diastereoisomers are mainly conjugated to glucuronides and sulfates in organism.

A mixture of both silybin diastereoisomers is used in the majority of reported biological, chemical and pharmacokinetic studies. For the first time, optically pure silybin A and silybin B were used for pharmacokinetic study in this thesis. The object of this work was determination of the concentration of free and total silybin in rats plasma in relation to time.

Theoretical introduction describes the current state of the problem of chemistry, pharmacology and pharmacokinetics of silybin diastereoisomers. Second part is focused on the selection of appropriate analytical column, chromatographic method and suitable procedure for preparation of biological samples for the determination of the silybin diastereoisomers. The experimental part is focused on the determination of free and total silybin A and B in the plasma of laboratory animals.

Our results clearly demonstrated that stereoselectivity plays an important role in the metabolism of silybins. Silybin B is conjugated in the body faster and to a greater extent than silybin A. The average amount (in the whole time range) of free silybin A was 18 % of the total plasma silybin A, while free silybin B was only 8 % of the total plasma silybin B.

Separate intragastric dosing of optically pure diastereoisomers of silybin to rats had a big influence on the shift of the maxima of mass concentrations.

Obsah

Seznam použitých symbolů a zkratk	9
1 ÚVOD	11
1.1 Cíle práce	11
2 TEORETICKÁ ČÁST	12
2.1 Polyfenoly	12
2.2 Flavonoidy	13
2.3 Flavonolignany	14
2.4 Silybin	15
2.4.1 Ostropestřec mariánský	16
2.4.2 Charakterizace flavonolignanů silymarinového komplexu	17
2.4.3 Biologické účinky silybinu a silymarinu	18
2.4.4 Biologické účinky čistých diastereoisomerů silybinu	19
2.4.5 Diastereoisomery silybinu a jejich separace	20
2.4.6 Osud silybinu v organismu a farmakokinetické studie	21
2.4.6.1 Studie absorpce silybinu v organismu	22
2.4.6.2 Studie tkáňové distribuce silybinu	25
2.4.6.3 Studie metabolismu silybinu	25
2.4.6.4 Studie eliminace silybinu	27
2.5 Biotransformace xenobiotik	28
2.5.1 První a druhá fáze metabolismu cizorodých látek	29
2.5.2 Konjugační enzymy	29
2.5.2.1 Sulfotransferasa	30
2.5.2.2 Glukuronosyltransferasa	30
2.5.2.2.1 Glukuronidace silybinu	30
2.5.3 Dekonjugační enzymy – hydrolasy	31
2.5.3.1 β -Glukuronidasa	32
2.5.3.2 Sulfatasa	32
2.6 HPLC – základní charakteristiky	33
2.6.1 Chromatografický systém	37

2.6.2	Limit detekce a limit stanovitelnosti	39
2.6.3	Technika vyhodnocování	39
2.6.4	Přehled HPLC metod stanovení silybinu	40
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	42
3.1	Použité chemikálie	42
3.2	Použitý biologický materiál a jeho skladování	42
3.3	Použité přístroje a vybavení	42
3.3.1	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	43
3.4	Použité metody	44
3.4.1	Studie <i>in vivo</i> - farmakokinetika diastereoisomerů silybinu A a B	44
3.4.2	Příprava mobilních fází a zásobních roztoků	44
3.4.3	Příprava vzorků pro stanovení volného silybinu	45
3.4.4	Příprava vzorků pro stanovení celkového silybinu	45
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	46
4.1	Určení chromatografických parametrů analytických kolon	46
4.1.1	Vliv lineární rychlosti mobilní fáze na účinnost kolony	47
4.1.2	Rozlišení a selektivita kolony	50
4.1.3	Další parametry analýz na testovaných kolonách	52
4.1.4	Limit detekce a limit stanovitelnosti	53
4.1.5	Srovnání separace a detekce na jednotlivých kolonách	55
4.2	HPLC metoda stanovení diastereoisomerů silybinu	56
4.2.1	Výtěžnost silybinu po úpravě vzorku – účinnost extrakce	56
4.3	Stanovení diastereoisomerů silybinu v plazmě potkanů	57
4.3.1	Farmakokinetický profil diastereoisomerů silybinu	62
5	ZÁVĚR	64
	Seznam citované literatury	66

Seznam použitých symbolů a zkratk

INN	International Nonproprietary Names
CAS RN	Chemical Abstracts Service - Registry Number
NMR	nukleární magnetická rezonance
MS	hmotnostní spektrometrie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
d. e.	diastereoisomerní nadbytek
RP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi
UDP	uridin-5'-difosfát
PAPS	3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát
acetyl-CoA	acetylkoenzym A
EC	Enzyme Commission
K_D	distribuční konstanta
c_s	koncentrace složky ve stacionární fázi [mol.l ⁻¹]
c_m	koncentrace složky v mobilní fázi [mol.l ⁻¹]
t_R	retenční čas [s]
t'_R	redukovaný retenční čas [s]
t_M	mrtvý retenční čas [s]
V_R	retenční objem [l]
V_M	mrtvý retenční objem [l]
V'_R	redukovaný retenční objem [l]
F	objemový průtok [l.s ⁻¹]
v	lineární rychlost mobilní fáze [m.s ⁻¹]
L	délka kolony [m]
k	retenční faktor
α	separační faktor
n	počet teoretických pater
Y	šířka píku v jeho základně [s]
$Y_{1/2}$	šířka píku v polovině jeho výšky [s]
H	výškový ekvivalent teoretického patra [m]
H_A	turbulentní difuze
H_B	podélná molekulární difuze
H_C	odpor proti přenosu hmoty ve stacionární fázi
H_D	odpor proti přenosu hmoty v mobilní fázi

H_{kol}	skutečný výškový ekvivalent teoretického patra kolony [m]
h	redukovaný výškový ekvivalent teoretického patra
h_{min}	minimální redukovaný výškový ekvivalent teoretického patra
d_p	střední průměr částic [m]
$T_{10\%}$	asymetrie píku v 10 % jeho výšky
$f_{10\%}$	přední část píku v 10 % jeho výšky [s]
$t_{10\%}$	zadní část píku v 10 % jeho výšky [s]
R	chromatografické rozlišení
C8	chemicky vázaná oktylová stacionární fáze
C18	chemicky vázaná oktadecylová stacionární fáze
UHPLC	ultraúčinná kapalinová chromatografie
LOD	limit detekce
LOQ	limit stanovitelnosti
IS	vnitřní standart
A_s	plocha píku standardu (integrál změny koncentrace standardu v eluentu s časem)
A_i	plocha píku stanovované látky (integrál změny koncentrace stan. látky v eluentu s časem)
ESI	ionizace elektrosprejem (electrospray ionisation)
id	vnitřní průměr (internal diameter)
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
p	tlak [MPa]
t_{celk}	celkový čas analýzy [s]
d_{skel}	průměr skeletonu monolitu (skeleton diameter) [m]
SPE	extrakce tuhou fází
R^2	korelační koeficient
c_g	hmotnostní koncentrace [g.l ⁻¹]

1 Úvod

Léčivé rostliny byly používány v lidovém léčitelství již od starověku. Do 18. století byla fytoterapie obvyklou formou léčby. Jednou z nejrozsáhleji studovaných a zdokumentovaných léčivých rostlin je ostropestřec mariánský (*Silybum marianum*), který byl poprvé popsán již ve spisech Theophrasta ve 4. století před naším letopočtem. Semena ostropestřce se již po staletí využívají k léčbě onemocnění jater, žlučových cest a zánětů.

Z těchto semen se získává směs přírodních flavonolignanů a polyfenolů, souhrnně nazývaná silymarin. Majoritní složkou této směsi je silybin, který je považován za nositele většiny biologických aktivit silymarinu. V současnosti je silymarin/silybin složkou řady fytopřípravků a doplňků stravy. Využívá se pro své antioxidační, hepatoprotektivní, protinádorové, chemoprotektivní a protizánětlivé účinky.

Přírodní silybin je v silymarinu obsažen jako přibližně ekvimolární směs dvou diastereoisomerů A a B, které mají odlišnou biologickou aktivitu. Ve většině dosavadních biologických a farmakokinetických studiích byla použita směs obou diastereoisomerů silybinu.

V této práci je pro farmakokinetickou studii poprvé separátně využít opticky čistý silybin A a silybin B. Předmětem studie je nalezení vhodné analytické metody a její aplikace pro zjištění koncentrace volného a celkového (volného a konjugovaného) silybinu v plazmě potkanů v závislosti na čase od podání dávky silybinu A nebo silybinu B.

Předkládaná diplomová práce metodicky navazuje na bakalářskou práci Preparativní diastereoisomerní dělení silybinu a jeho sulfátů pomocí RP-HPLC, Petra Kolářová, 2010.

1.1 Cíle práce

- výběr vhodné chromatografické kolony a metody pro stanovení diastereoisomerů silybinu v plazmě
- optimalizace úpravy vzorků plazmy
- HPLC stanovení množství volného (nekonjugovaného) silybinu
- enzymatická hydrolýza glukuronidů a sulfátů silybinu
- stanovení celkového (volného a konjugovaného) silybinu

2 Teoretická část

2.1 Polyfenoly

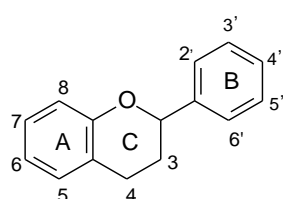
Polyfenoly jsou významnou skupinou biologicky aktivních přírodních látek. Mezi nejběžnější rostlinné polyfenoly patří fenolové kyseliny, stilbeny, lignany a flavonoidy [Modrianský 2003]. V přírodě se vyskytují především jako β -glykosidy.

Polyfenoly jsou produkovány rostlinami jako sekundární metabolity a mají za úkol rostlinu chránit před požírači, patogenními mikroorganismy či UV zářením nebo naopak k rostlině přilákat opylovače [Jahodář 2006]. Polyfenolové sloučeniny vykazují široké spektrum fyziologicky příznivých účinků (antioxidační, chemoprotektivní a protizánětlivé) [Ferrari 2003]. Jsou zastoupeny především v ovoci a zelenině. Jejich doporučený denní příjem potravou se pohybuje okolo 1 g [Middleton 2000].

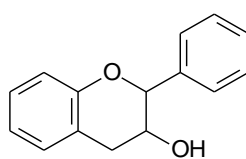
Orální biodostupnost polyfenolů se pohybuje mezi 2-20 % [Hu 2007]. Hlavním místem jejich resorpce je tenké a tlusté střevo. Převládající metabolickou přeměnou polyfenolů jsou konjugační reakce v játrech. Bakteriální enzymy (glukosidasy, glukuronidasy, sulfatasy) ve střevech štěpí glykosidy i vzniklé konjugáty na aglykony, které mohou být zpětně reabsorbovány [Liu 2007, Zhang 2007]. Polyfenoly se vylučují z organismu močí nebo žlučí převážně ve formě polárních konjugátů.

2.2 Flavonoidy

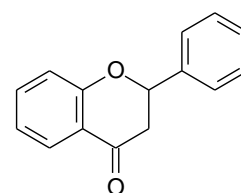
Flavonoidy patří do rozsáhlé skupiny polyfenolových sloučenin. Základní strukturou flavonoidů je flavan (**1**) který je tvořen dvěma benzenovými kruhy A, B a pyranovým kruhem C kondenzovaným s kruhem A. Strukturní variabilita přírodních flavonoidů je vysoká, obvykle se liší počtem a pozicí hydroxy a methoxy skupin. Flavonoidy se dělí podle stupně oxidace pyranového kruhu na flavany, flavanoly (**2**), flavanony (**3**), flavony (**4**), flavonoly (**5**), anthokyanidiny, biflavonoidy, neoflavony (kumariny) a jejich isoderiváty (isoflavony (**6**)) (viz Obr. 1) [Volf 2008]. Přírodní flavonoidy se nejčastěji vyskytují ve formě *O*-glykosidů.



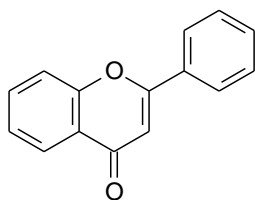
1 – flavan



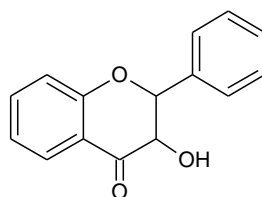
2 – flavanol



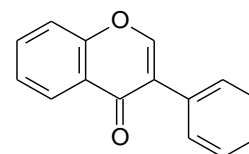
3 – flavanon



4 – flavon



5 – flavonol



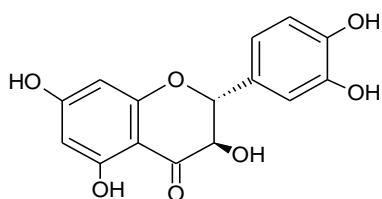
6 – isoflavon

Obr. 1 – Strukturní vzorce nejdůležitějších skupin flavonoidů.

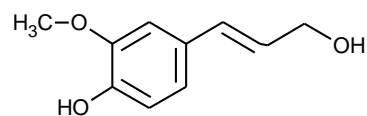
Většina flavonoidů vykazuje silnou antioxidační aktivitu – působí jako vychytávače reaktivních radikálů (např. hydroxylový a hydroperoxidový radikál), chelatují některé prooxidační ionty kovů (Fe^{2+} , Fe^{3+} , Al^{3+} , Cu^{2+} , Mn^{2+}), potlačují peroxidaci lipidů v řadě biologických systémů (mitochondrie) a tvorbu superoxidového radikálu. Antioxidační aktivita flavonoidů je závislá především na poloze a počtu hydroxylových skupin v molekule, vliv má i jejich glykosylace. Flavonoidy snižují pravděpodobnost výskytu kardiovaskulárních chorob a nádorů, mají protizánětlivý účinek a jsou důležitými antivirovými látkami [Volf 2008].

2.3 Flavonolignany

Flavonolignany jsou látky, které se skládají z flavanonu taxifolinu (**7**), k němuž je v průběhu biosyntézy oxidativní radikálovou adicí připojena molekula koniferylalkoholu (**8**) [Jegorov 1996]. Koniferylalkohol tvoří spolu se sinapylalkoholem a *p*-kumarylalkoholem základní stavební jednotky ligninu, po němž dostala tato skupina flavonoidních látek název flavonolignany. Mezi flavonolignany řadíme například silybin, isosilybin, silychristin a silydianin.



7 – taxifolin



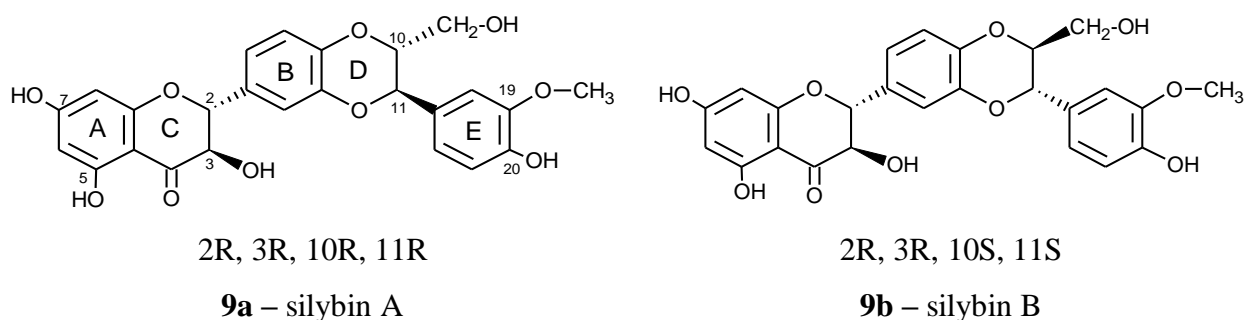
8 – koniferylalkohol

Obr. 2 – Stavební jednotky flavonolignanů.

2.4 Silybin

Flavonolignan silybin (INN silibinin, CAS RN: 22888-70-6, $M = 482,4 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) je hlavní biologicky aktivní složkou komplexu přírodních flavonolignanů a polyfenolů silymarinu, který se získává ze semen ostropestřce mariánského (*Silybum marianum*). Silymarin je aktivní látkou mnoha léčivých přípravků a doplňků stravy.

Silybin je v silymarinu obsažen jako přibližně ekvimolární směs dvou diastereoisomerů – silybinu A (**9a**) a silybinu B (**9b**).



Obr. 3 – Diastereoisomery silybinu.

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.

Silybin poprvé (v roce 1960) z extraktu semen ostropestřce mariánského izolovali Janiak a Hänsel [Janiak 1960]. V roce 1968 Pelter a Hänsel navrhli strukturu silybinu na základě dat z nukleární magnetické rezonance (NMR) a hmotnostní spektrometrie (MS) [Pelter 1968]. Struktura byla později potvrzena dalšími studiemi [Hansel 1972, Pelter 1975].

Biosyntéza silybinu probíhá oxidativní radikálovou adicí koniferylalkoholu na taxifolin, za katalýzy peroxidasou [Schrall 1977]. Ostatní flavonolignany vznikají rovněž reakcí koniferylalkoholu a taxifolinu, ale odlišným mechanismem.

2.4.1 Ostropestřec mariánský

Ostropestřec mariánský (*Silybum marianum*) (LINNANEUS) GAERTNER Fruct. Sem. Pl. – Syn.: *Carduus marianus* je jednoletá bodlakovitá bylina z čeledi hvězdnicovité (*Asteraceae*). Dorůstá výšky až 150 centimetrů, má silnou větvenou lodyhu a přízemní listy v růžici, které jsou bíle skvrnitě, lesklé a ostře zubaté [Grau 1996, Slavík 2004]. Ostropestřec kvete od června do srpna červenofialově (viz Obr. 4). Plody se sbírají od září do října a po jejich usušení se z chmýřitých hlavic vymlátí semena, která se dále zpracovávají.

Semena obsahují 26-28 % bílkovin, 25-35 % jedlého oleje a 500-800 mg.kg⁻¹ tokoferolu. Hlavními nositeli léčivých účinků jsou flavonolignany a polyfenoly. Semena dále obsahují tyramin, histamin, cukry, alkaloidy, saponiny a vitamíny (např. C, E a K) [Morazzoni 1995].

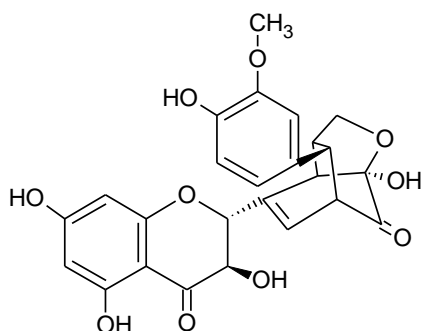


Obr. 4 – Květ a semena ostropestřce mariánského (vlastní fotografie).

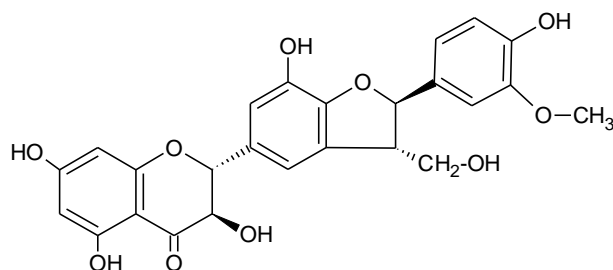
Ostropestřec mariánský patří mezi nejdéle známé léčivé rostliny. Poprvé je popisován ve spisech Theophrasta (4. st. př. n. l.) pod názvem „Pternix“ [Jegorov 1996]. Již od starověku se semena používala při akutních i chronických zánětech jater a cirhózách, při žloutence, žlučnickových kamencích, onemocnění dvanácterníku, sleziny a při regeneraci cév [Korbelář 1981, Váňa 1990].

2.4.2 Charakterizace flavonolignanů silymarinového komplexu

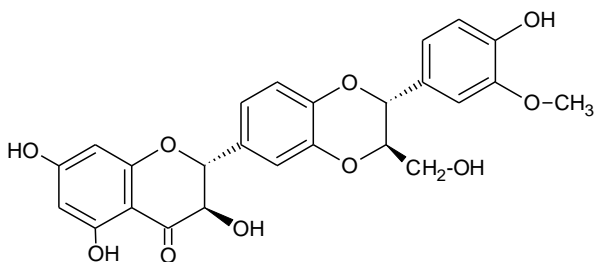
Ze semen ostropestřce mariánského se získává standardizovaný extrakt flavonoidů a polyfenolů – silymarin. V něm jsou nejvíce zastoupeny flavonolignany silybin (Obr. 3, **9a** a **9b**), silydianin (**10**), silychristin (**11**), isosilybin (**12**) a 2,3-dehydrosilybin (**13**). Silymarin dále obsahuje flavonoidy kvercetin (**14**), taxifolin, 2,3-dehydrosilychristin a další neidentifikované polymerní fenolické sloučeniny [Gažák 2007]. Hlavní složky silymarinu jsou uvedeny na obrázku 5.



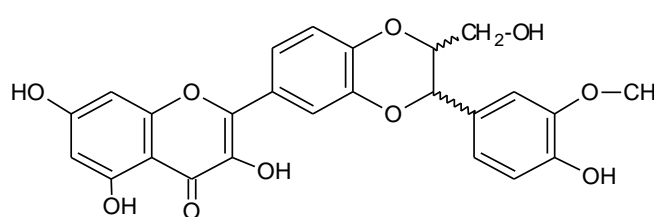
10 – silydianin



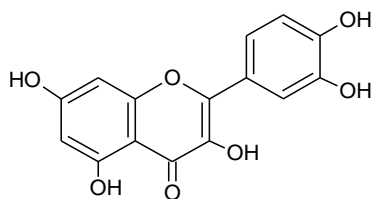
11 – silychristin



12 – isosilybin



13 – 2,3-dehydrosilybin



14 – kvercetin

Obr. 5 – Flavonolignany a flavonoidy obsažené v silymarinu.

2.4.3 Biologické účinky silymarinu a silybinu

Silymarin má antifibrotickou, protizánětlivou a imunomodulační aktivitu [Flora 1998, Johnson 2003, Katiyar 2005]. Pro jeho hepatoprotektivní vlastnosti se ve velké míře používá při léčbě jater [Carini 1992, Flora 1998]. Jeho účinnost (bez vedlejších účinků) byla prokázána při léčbě pacientů s alkoholickou cirhózou [Ferenci 1989].

Za většinu biologických účinků silymarinu je zodpovědný silybin, což bylo prokázáno v biologických testech. Silybin se používá jako hepatoprotektikum při cirhóze, chronické hepatitidě, alkoholismu, při léčbě gastrointestinálního traktu, pankreatu a po intoxikacích [Gažák 2007, Gažák 2009]. V experimentech na zvířatech bylo prokázáno, že silymarin a silybin chrání játra potkanů nebo myši před poškozením vyvolaným akutní intoxikací ethanolem [Valenzuela 1985], tetrachlormethanem [Letteron 1990, Favari 1997], cisplatinou [Mansour 2006], thaliem [Mourelle 1988] a paracetamolem [Muriel 1992]. Silybin je používán jako antidotum při otravě muchomůrkou zelenou (*Amanita phalloides*), protože při akutní otravě phalloidinem a α -amanitinem inhibuje vazbu toxinů na povrchové receptory hepatocytů a brání aktivnímu transportu toxinů dovnitř jaterních buněk [Hruby 1983, Vogel 1984].

Silybin je díky své polyfenolické struktuře silným antioxidantem [Pietrangelo 1995], funguje jako akceptor volných reaktivních radikálů [Hoh 2006], má schopnost inhibovat lipidovou peroxidaci, zvyšuje vylučování toxických látek z organismu [Baer-Dubowska 1998] a stimuluje proteosyntézu [Džubák 2006].

Silybin ovlivňuje procesy karcinogeneze a nádorového bujení, je využíván k prevenci a léčbě rakoviny, především rakoviny prostaty [Zhao 2000, Singh 2006] a tlustého střeva [Kohno 2002]. V neposlední řadě se silybin využívá v dermatologii a kosmetice [Afaq 2002, Katiyar 2005].

Biologická dostupnost silybinu je limitována jeho nízkou rozpustností ve vodě ($0,02 \text{ g.l}^{-1}$) [Koch 1980]. *In vivo* je téměř nemožné dosáhnout při orálním podání jeho toxické koncentrace, a nejen proto je považován za bezpečnou látku. Silybin je látka s velmi dobrou snášenlivostí a je užíván ve formě tablet (např. Flavobion[®], Legalon[®], Ungolen[®] a Ladymarin[®]).

Silymarin je netoxický u akutních zkoušek a stejně tak i v subchronických a chronických testech [Hahn 1968, Rainone 2005]. Zatím nebylo zjištěno mnoho vedlejších účinků potravinových doplňků z ostropestřce mariánského. Z nežádoucích účinků se mohou objevit bolesti hlavy, zažívací obtíže a podráždění kůže [Jacobs 2002].

2.4.4 Biologické účinky čistých diastereoisomerů silybinu

Biologické účinky stereoisomerů (enantiomerů, diastereoisomerů) přírodních i syntetických látek jsou většinou rozdílné, a proto je velmi důležité jednotlivé stereoisomery od sebe efektivně oddělit a studovat jejich účinky odděleně.

Diastereoisomery silybinu jsou velmi obtížně dělitelné. Proto byly jejich biologické vlastnosti dosud studovány převážně za použití přírodního silybinu (směs silybinu A a B) nebo silymarinu. Studií, při kterých byly diastereoisomery silybinu zkoumány odděleně, je velice málo [Křen 2000, Han 2004, Davis-Searles 2005, Plíšková 2005, Li 2008].

Rozdílnost biologických účinků diastereoisomerů silybinu prokazuje studie karcinomu lidské prostaty. Z testovaných látek (silybinu A a B, isosilybinu A a B a dalších složek silymarinu) byl nejúčinnější v potlačení genu topoisomerasy II α v buňkách DU145 (androgen-independentní buněčná linie rakoviny prostaty) isosilybin B. Silybin B byl neaktivnější v G1 fázi buněčného cyklu buněk DU145. Z toho vyplývá, že extrakty obohacené o isosilybin B nebo samotný isosilybin B, by měly mít lepší účinnost v prevenci a léčbě rakoviny prostaty [Davis-Searles 2005]. V jiné studii bylo zjištěno, že silybin B interaguje s estrogenním receptorem, zatímco silybin A je neaktivní [Plíšková 2005].

Diastereoisomery silybinu mají odlišný metabolismus (kap. 2.4.6.3 a 2.5.2.2.1). Právě proto je nezbytné použít pro další studium těchto efektů opticky čistých diastereoisomerů silybinu.

2.4.5 Diastereoisomery silybinu a jejich separace

Ekvimolární směs diastereoisomerů tvořící přírodní silybin není prakticky možné oddělit klasickými separačními metodami jako je sloupcová chromatografie na silikagelu či krystalizace. Je možné je separovat pomocí semipreparativní nebo preparativní vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) [Kim 2003a, Graf 2007, Hoh 2007, Li 2008, Hadad 2009, Kolářová 2010]. Takto lze však získat maximálně desítky miligramů opticky čistých diastereoisomerů a tyto metody jsou instrumentálně a časově náročné.

Další možnost preparativní separace diastereoisomerů silybinu představuje jejich dělení ve formě peracetylovaných galaktosidů [Křen 2009]. Nejprve je ze směsného silybinu připraven silybin-23-*O*- β -pentaacetyl-galaktopyranosid. Poté je tato směs dělena na jednotlivé diastereoisomery A a B pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu. Cukerná složka je nakonec ze silybinu odstraněna po deacetylaci pomocí β -galaktosidasy. Tato metoda je vhodná pro přípravu stovek miligramů až jednotek gramů jednotlivých silybinů, neboť účinnost separace diastereoisomerní směsi galaktosidů silybinu je nízká. Pro získání velmi čistých diastereoisomerů o diastereoisomerním nadbytku (d. e.) $> 95 \%$ je nutné separaci několikrát opakovat.

V roce 2010 byla vyvinuta metoda poskytující až desítky gramů opticky čistých diastereoisomerů silybinu (d. e. $> 95 \%$) [Gažák 2010]. Metoda je založena na chirální separaci diastereoisomerů silybinu Novozymem 435 (lipasa imobilizovaná na polyakrylamidové pryskyřici) při použití dvou různých systémů rozpouštědel (toluen/*n*-butanol nebo *terc*-butylmethylether/*n*-butanol).

2.4.6 Osud silybinu v organismu a farmakokinetické studie

Obecně platí, že po vstupu cizorodé látky do organismu a jejím vstřebání dochází k interakci této látky se složkami organismu. Probíhající procesy lze rozdělit do dvou fází – farmakokinetické (osud xenobiotika v organismu až k dosažení místa účinku) a farmakodynamické (reakce xenobiotika s receptory v místě působení, vyvolávající odpovídající biologický účinek).

Biochemické procesy farmakokinetické fáze sestávají z uvolnění účinné látky z aplikované formy (**L**iberation), vstřebávání do krevního a lymfatického oběhu (**A**bsorption), rozdělení účinné látky v organismu (**D**istribution), chemické přeměny (**M**etabolism) a vyloučení (**E**xcretion). Farmakokinetická fáze bývá proto označována jako LADME-systém. Analýzou časového průběhu farmakokinetické fáze se zabývá farmakokinetika [Vodrážka 1993].

Pro studium metabolismu silybinu lze obecně využít metody *in vitro* nebo *in vivo*. V přístupu *in vitro* patří mezi často užívaný biologický materiál mikrosomální frakce jaterního homogenátu. Mikrosomy jsou membránové vesikuly vzniklé po rozbití endoplazmatického retikula. V membráně mikrosomů jsou přítomny enzymy první fáze biotransformace xenobiotik (např. cytochromy P450) a některé enzymy druhé fáze (např. uridin-5'-difosfát-glukuronosyltransferasy (UDP-glukuronosyltransferasy)). Dále se využívají hepatocyty, tkáňové řezy a perfundované orgány.

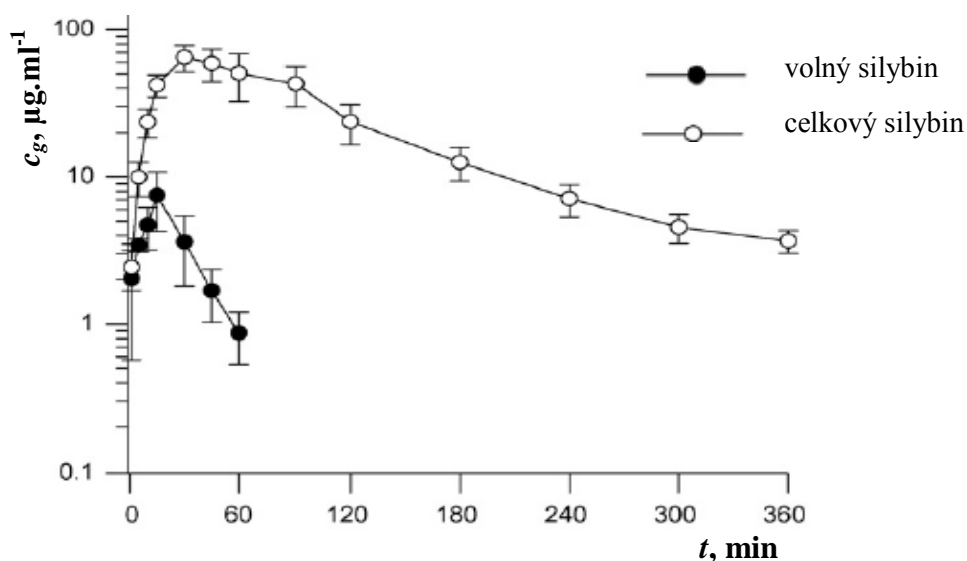
Experimenty *in vivo* jsou prováděny na zvířecích modelech. Při studiu silybinu patří k nejčastěji užívaným zvířatům potkan a myš. Při vyhodnocování výsledků těchto studií je však nutné vzít v úvahu mezidruhové rozdíly v aktivitě a hlavně substrátové specifitě biotransformačních enzymů.

2.4.6.1 Studie absorpce silybinu v organismu

Silybin byl v klinických studiích podáván dobrovolníkům buď v čisté formě, nebo v silymarinových kapslích. Srovnávací studii biologické dostupnosti silybinu z různých silymarinových tablet (Liverman, Legalon, Silymarin) u zdravých dobrovolníků provedli Kim a kol. [Kim 2003b]. Maximální koncentrace silybinu v plazmě dobrovolníků byla 1 až 2 hodiny od podání tablety.

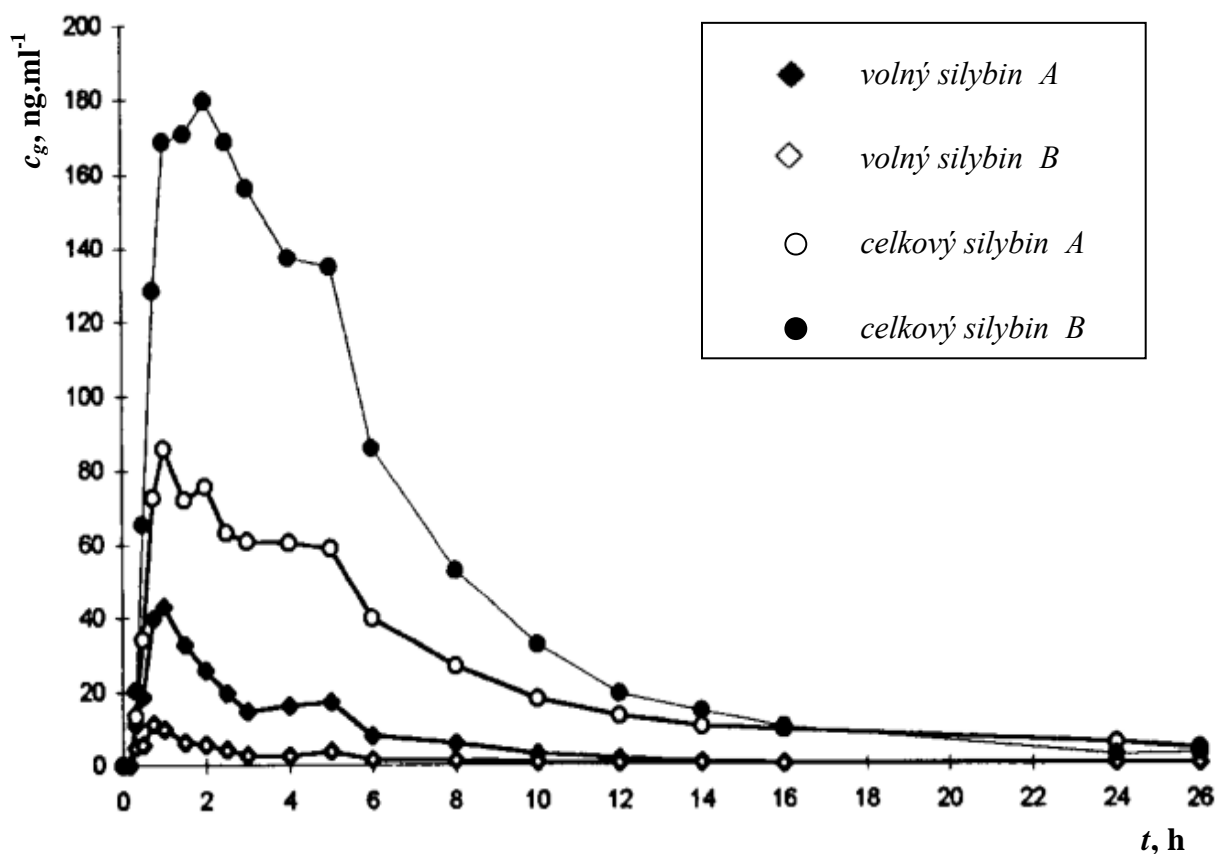
Kosina a Bartek stanovili silybin v krevní plazmě dvou dobrovolníků, kteří užívali 3× denně jednu tabletu Silymarinu nebo tabletu Legalonu [Kosina 2000]. Nejvyšší koncentrace silybinu v plazmě byla 2 hodiny od podání tablety.

Wu a kol. analyzovali silybin v plazmě a žluči potkanů, kterým byl podáván směsný silybin intragastrickou sondou (500 mg.kg^{-1}) a intravenózně (100 mg.kg^{-1}) [Wu 2007]. Hmotnostní koncentrace (c_g) silybinu ve žluči byly vyšší než v plazmě za stejné období, což naznačuje, že ve žluči je soustředěn aktivní transport silybinu. Maximální hmotnostní koncentrace volného silybinu v plazmě byla v čase 11 minut a celkového silybinu v plazmě v čase 30 minut od podání dávky (Obr. 6).



Obr. 6 – Hmotnostní koncentrace volného a celkového silybinu v plazmě v závislosti na čase od podání orální dávky 500 mg.kg^{-1} směsného silybinu [Wu 2007].

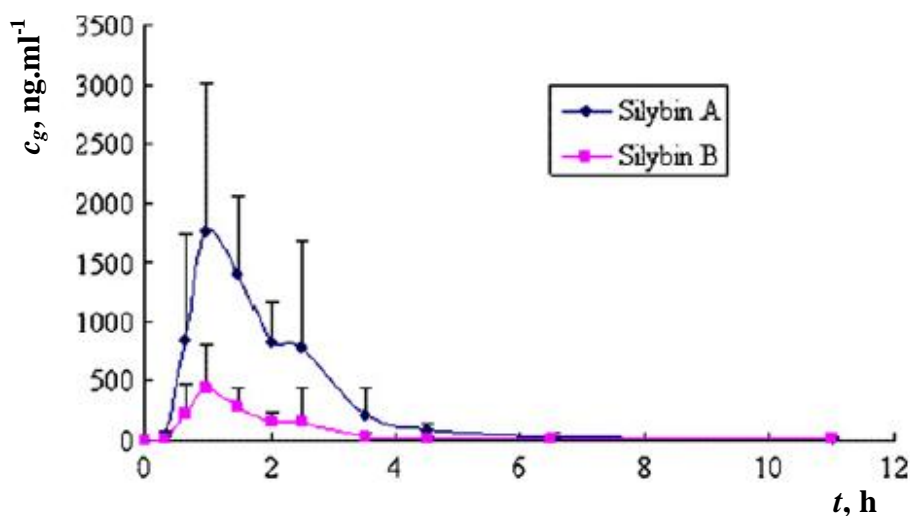
Rickling a kol. stanovili volný i celkový silybin v plazmě (Obr. 7) deseti dobrovolníků po jedné orální dávce 140 mg silymarinu (53,2 mg silybinu) [Rickling 1995]. Hmotnostní koncentrace volného a celkového silybinu B byly přibližně 4× vyšší než volného a celkového silybinu A. 23 % silybinu A a 3 % silybinu B bylo v plazmě nekonjugováno.



Obr. 7 – Hmotnostní koncentrace volného a celkového silybinu A a B v plazmě v závislosti na čase od podání dávky 53,2 mg silybinu [Rickling 1995].

Systémová biologická dostupnost silybinu může být zvýšena jeho komplexací s fosfatidylcholinem [Li 2006]. Lipofilní charakter silybin-fosfatidylcholinového komplexu usnadňuje resorpci silybinu přes biologické membrány v trávicím traktu [Barzaghi 1990]. Po perorálním podání silymarinu a silybin-fosfatidylcholinového komplexu potkanům bylo zjištěno, že relativní biologická dostupnost silybin-fosfatidylcholinového komplexu byla 10× vyšší než silymarinu [Morazzoni 1993]. Barzaghi a kol. prokázali, že po podání jedné perorální dávky komplexu silybin-fosfatidylcholinu a silymarinu (ekvivalent 360 mg silybinu) devíti zdravým dobrovolníkům, byla relativní biologická dostupnost silybin-fosfatidylcholinového komplexu 3,4× vyšší než silymarinu [Barzaghi 1990].

Li a kol. stanovili volný silybin v plazmě 22 dobrovolníků, kterým byl orálně podán komplex silybin-fosfatidylcholinu (ekvivalent 280 mg silybinu) [Li 2008]. Hmotnostní koncentrace volného silybinu B v plazmě byly několikanásobně nižší než volného silybinu A (Obr. 8).



Obr. 8 – Hmotnostní koncentrace volného silybinu A a volného silybinu B v plazmě v závislosti na čase od podání dávky komplexu silybin-fosfatidylcholinu [Li 2008].

2.4.6.2 Studie tkáňové distribuce silybinu

Zhao a kol. stanovili volný a konjugovaný silybin ve tkáních myší, kterým bylo perorálně podáno $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ silybinu [Zhao 1999]. Hmotnostní koncentrace volného i konjugovaného silybinu ve tkáních byly maximální po 1 hodině po podání (Tab. 1).

Tab. 1 – Hmotnostní koncentrace volného a konjugovaného silybinu ve tkáních po 1 hodině (upraveno dle [Zhao 1999]).

	volný silybin $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ tkáň	konjugovaný silybin $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ tkáň
játra	$8,8 \pm 1,6$	$5,7 \pm 0,7$
plice	$4,3 \pm 0,8$	$2,8 \pm 0,7$
žaludek	$123,0 \pm 21,0$	$270,0 \pm 49,0$
kůže	$1,4 \pm 0,5$	$4,3 \pm 0,4$
prostata	$2,5 \pm 0,4$	$6,1 \pm 1,7$
slinivka břišní	$5,8 \pm 1,1$	$10,6 \pm 1,5$

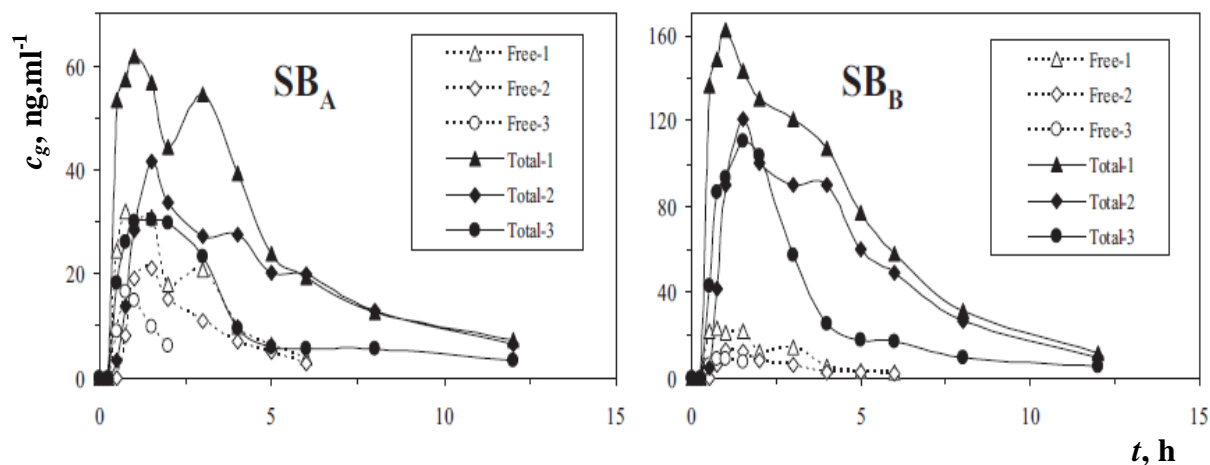
2.4.6.3 Studie metabolismu silybinu

Silybin je metabolizován především konjugačními reakcemi v II. fázi metabolismu (kap. 2.5.1). Nejvíce se uplatňuje sulfatace a glukuronidace (kap. 2.5.2.2.1).

Studie ukázaly, že po perorálním podání silymarinových kapslí šesti dobrovolníkům bylo v průměru pouze 10 % z celkového množství silybinu v plazmě nekonjugováno [Weyhenmeyer 1992]. Po podání silybinu byla jeho většina konjugována na sulfáty a/nebo glukuronidy [Rickling 1995, Křen 2000, D'Andrea 2005].

Hoh a kol. identifikovali metabolity silybinu v plazmě od pacientů s rakovinou tlustého střeva, kterým byl orálně podáván komplex silybinu s fosfatydimcholinem (obsahující 480 mg silybinu) třikrát denně po dobu jednoho týdne [Hoh 2007]. Hmotnostní spektrometrií byly identifikovány následující konjugáty silybinu: silybin monoglukuronid, silybin diglukuronid, silybin glukuronid sulfát a silybin monosulfát. Dále byl v malém množství přítomen *O*-demethyl silybin glukuronid a silybin triglukuronid.

Wen a kol. studovali metabolický profil volných, konjugovaných a celkových silymarinových flavonolignanů [Wen 2008]. Vzorčky plazmy byly získány od tří dobrovolníků, kterým byla podána jedna perorální dávka 600 mg silymarinu. Flavonolignany byly v organismu metabolizovány na jejich konjugáty (glukuronidy a sulfáty), které představovaly přibližně 83 % z celkového množství. Silybin B se konjugoval ve větší míře (přibližně 3× více) než silybin A (Obr. 9).



Obr. 9 – Hmotnostní koncentrace volného (*Free*) a celkového (*Total*) silybinu A (SB_A) a silybinu B (SB_B) v plazmě (individuálně pro každého dobrovolníka) v závislosti na čase od podání dávky 600 mg silymarinu [Wen 2008].

Han a kol. se zabývali stereoselektivním metabolismem diastereoisomerů silybinu v glukuronidačním procesu [Han 2004]. Silybin A a silybin B inkubovali odděleně s mikrosomy z hovězích jater. Následně byly izolovány tyto metabolity: silybin B-7-*O*- β -D-glukuronid, silybin B-20-*O*- β -D-glukuronid, silybin A-7-*O*- β -D-glukuronid a silybin A-20-*O*- β -D-glukuronid. Ukázalo se, že v glukuronidačním procesu silybinu má významnou roli stereoselektivita. Silybin B byl glukuronidován mnohem efektivněji a rychleji než silybin A a glukuronidace silybinu B byla mnohem častější v poloze C-20, zatímco v případě silybinu A probíhala srovnatelně v poloze C-20 a v poloze C-7. Více o glukuronidaci silybinu je uvedeno v kapitole 2.5.2.2.1.

2.4.6.4 Studie eliminace silybinu

Silybin je bez ohledu na způsob podání vylučován močí převážně nezměněn, za jeden den je z těla močí vyloučeno 1-7 % dávky silybinu [Lorenz 1984, Weyhenmeyer 1992]. Většina silybinu se vylučuje hepatobiliárně a enterohepatální recirkulací v konjugované formě. To způsobuje, že koncentrace silybinu ve žluči je až 100× vyšší než v krvi [Wu 2007].

U potkanů i u lidí bylo prokázáno velmi rychlé odbourání volného i konjugovaného silybinu [Barzagli 1990, Mascher 1993, Rickling 1995]. Po perorálním podání 560 mg silymarinu (ekvivalent 240 mg silybinu) byl průměrný eliminační poločas 6,32 hodiny [Lorenz 1984].

2.5 Biotransformace xenobiotik

Cizorodé látky (xenobiotika) jsou látky tělu nevlastní (léčiva, potravinová aditiva, chemikálie aj.), které vstupují do organismu různými způsoby (perorálně, inhalací, dermálně, intravenózně). Po vstupu do organismu a vstřebání (resorpci) podléhají biotransformaci, která je základním mechanismem pro udržení homeostázy organismu. Jen minimum látek se z organismu vylučuje v nezměněné podobě.

Při biotransformaci se xenobiotika přeměňují na metabolity, které mají nižší nebo jinou aktivitu než původní látka. V některých případech však může dojít i ke tvorbě reaktivních produktů namísto detoxikace. Tyto reakce se pak označují jako metabolické aktivace, protože vedou k více toxickým meziproductům, které mohou přispívat ke vzniku či rozvoji alergie, karcinogeneze, mutageneze či teratogeneze. Příkladem toxifikace může být sulfokonjugace aromatických hydroxylaminů, kdy vzniklé reaktivní intermediáty mají mutagenní účinky [Meinl 2002].

Přeměny cizorodých látek jsou v organismu zprostředkovávány enzymy se širokou substrátovou specificitou a tkáňovou distribucí. Většina těchto reakcí probíhá v játrech, v menší míře také v trávicím traktu, ledvinách, plicích, kůži, slinivce a slezině [Parkinson 2001].

V buňkách je metabolismus cizorodých látek situován převážně v endoplazmatickém retikulu a cytosolu. Produkty jsou zpravidla více hydrofilní než výchozí látky – modifikovaná xenobiotika se z těla vylučují močí, stolicí a potem, těkavé látky plicemi. Některé látky, které byly biotransformovány v játrech, se mohou dostat do žluče a následně do střeva. Část hydrofilních látek se nemůže ve střevě zpět resorbovat, ale někdy může dojít vlivem bakteriální hydrolyzy konjugátů ke zpětné resorpci toxické látky a vytváří se tak enterohepatální oběh [Knejzlík 2000].

Biotransformační reakce jsou ovlivněny věkem, pohlavím, zdravotním stavem, genetickými dispozicemi a podmínkami prostředí [Vodrážka 1993]. Obecně se rozdělují do dvou fází.

2.5.1 První a druhá fáze metabolismu cizorodých látek

První fáze biotransformace probíhá v mikrosomech endoplazmatického retikula. Dochází k reakcím (oxidaci postranního řetězce, hydroxylaci aromátů, deaminaci, tvorbu epoxidů, sulfoxidaci, *N*-hydroxylaci, redukci a hydrolytické reakce), které modifikují molekulu cizorodé látky tak, aby byla schopna konjugace s aminy, kyselinami a alkoholy (II. fáze biotransformace).

Produkty těchto reakcí jsou látky lépe rozpustné ve vodě než původní xenobiotikum [Knejzlík 2000]. Polarizace je docíleno připojením nebo odhacením funkčních skupin (-OH, -NH₂, -COOH, -SH). Těchto přeměn se účastní enzymy oxidoreduktasy (např. cytochromy P450, alkoholdehydrogenasa, aldehyddehydrogenasa, mono-, di- a polyaminoxidasa, aldehydoxidasa) a hydrolasy (epoxidhydrolasy, peptidasy, esterasy) [Beedham 1997]. Reakce I. fáze mohou, ale nemusí předcházet reakcím II. fáze. Je-li metabolit I. fáze dostatečně polární, může být vyloučen ledvinami. Málo polární produkty I. fáze vstupují do fáze II.

V druhé fázi biotransformace (probíhající převážně v cytoplazmě buněk) se xenobiotikum konjuguje s endogenními látkami, například s uridin-5'-difosfát-glukuronátem (UDP-glukuronátem), 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfátem (PAPS), acetylkoenzymem A (acetyl-CoA), glutathionem, glycinem a dalšími aminokyselinami za vzniku polárních konjugátů, které jsou z organismu vyloučeny močí, žlučí nebo stolicí.

2.5.2 Konjugační enzymy

Konjugační enzymy (transferasy) zprostředkovávají přenos skupin (např. sulfo-, glukuronyl-, methyl-, amino-) z jejich donoru na akceptor [Straub 1962].

Nejdůležitějšími konjugačními enzymy jsou UDP-glukuronosyltransferasy, sulfotransferasy, *N*-acetyltransferasy, glutathion *S*-transferasy, thiopurin *S*-methyltransferasy, katechol *O*-methyltransferasy a enzymy účastnící se konjugace s aminokyselinami.

2.5.2.1 Sulfotransferasa

Sulfatace je katalyzována enzymy rodiny sulfotransferas [Kauffman 2004], které přenášejí sulfátovou skupinu z kofaktoru (PAPS) na vhodný substrát. Sulfotransferasy se dělí podle své substrátové specifity na arylsulfotransferasy, hydroxysteroid sulfotransferasy a ester sulfotransferasy [Chapman 2004]. Sulfatační systém se nachází především v buněčném cytosolu a v endoplazmatickém retikulu [Kauffman 2004].

Sulfotransferasy se podílejí na metabolismu velkého počtu endogenních látek (např. neurotransmiterů a hormonů) i xenobiotik, především na detoxikaci a modulaci biologické aktivity mnoha léků, drog a toxických chemikálií [Kauffman 2004]. Jsou zapojeny do celé řady biologických procesů, včetně hormonální regulace a buněčné signalizace [Chapman 2004].

2.5.2.2 Glukuronosyltransferasa

Hydroxysloučeniny (alkoholy a fenoly), mezi něž patří i silybin, dále aminy, iminy, thioly, alifatické kyseliny a aromatické kyseliny se v organismu konjugují nejčastěji s UDP-glukuronátem, jehož donorem je UDP-glukuronová kyselina, na β -glukuronosidy (též nazývané glukuronidy nebo glukosiduronáty). Produktem reakce jsou ethery nebo estery [Mireille 1998]. Tyto konjugační reakce zprostředkovávají enzymy patřící do superrodiny membránově vázaných enzymů: UDP-glukuronosyltransferasy (EC 2.4.1.17) [Fisher 2001].

Tyto enzymy mají širokou tkáňovou distribuci, přičemž nejvíce jsou zastoupeny v játrech a ve střevech, ale jejich exprese byla popsána i v ledvinách [Sutherland 1993], mozku, slinivce [King 1999] a placentě [Collier 2002]. V buňce jsou lokalizovány v membráně endoplazmatického retikula [Tukey 2000].

2.5.2.2.1 Glukuronidace silybinu

Silybin B je glukuronidován rychleji a efektivněji než silybin A [Weyhenmeyer 1992, Han 2004, Jančová 2011]. Křen a kol. [Křen 2000] glukuronidovali opticky čistý silybin A (podle současné nomenklatury [Kim 2003a] však šlo o silybin B) pomocí glukuronosyltransferasy z hovězích jater. Získali tři β -glukuronidy silybinu: 20-*O*- β -D-glukuronid (27 %), 7-*O*- β -D-glukuronid (63 %) a 5-*O*- β -D-glukuronid (2,5 %). Hlavním

metabolitem u lidí byl 20-*O*- β -D-glukuronid silybinu, což bylo nečekané, jelikož pozice C-20 byla považována za méně reaktivní vzhledem k možným intramolekulárním vodíkovým vazbám se sousední methoxy skupinou. Dále bylo zjištěno, že antiradikálová aktivita 20-*O*- β -D-glukuronidu silybinu byla výrazně nižší než volného silybinu, avšak aktivita 7-*O*- β -D-glukuronidu silybinu byla vyšší.

V další studii [Han 2004] byly silybin A a silybin B odděleně inkubovány s hovězími jaterními mikrosomy. Silybin B byl častěji glukuronidován v pozici C-20, zatímco silybin A byl konjugován stejně často v pozici C-20 i C-7. Může to být tím, že v lidských a hovězích mikrosomech je přítomen rozdílný systém isoenzymů, který má rozdílnou stereoselektivitu pro substráty.

Toto potvrdila i studie [Jančová 2011] využívající ke glukuronidaci silybinu lidské jaterní mikrosomy. Silybin byl metabolizován za vzniku čtyř hlavních monoglukuronidů: silybin A-7-*O*- β -D-glukuronidu, silybin B-7-*O*- β -D-glukuronidu, silybin A-20-*O*- β -D-glukuronidu a silybin B-20-*O*- β -D-glukuronidu. Lidské rekombinantní UDP-glukuronosyltransferasy přednostně reagovaly se silybinem B a preferovaným místem glukuronidace byl C-7 uhlík.

2.5.3 Dekonjugační enzymy – hydrolasy

Jedná se o nejpočetnější třídu enzymů, které hydrolyzují látky povahy esterů a amidů za vzniku fenolů, alkoholů a karboxylových kyselin. Podle typu štěpených vazeb se dělí na esterasy, glykosidasy, amidasy, peptidasy, polyfosfatasy, C-S hydrolasy a C-C hydrolasy [Vodrážka 1992]. Hydrolasy se ve studiích často používají při štěpení glukuronidů silybinu a sulfátů silybinu na jejich aglykony. Tímto způsobem lze zjistit množství konjugovaného silybinu (glukuronidů a sulfátů silybinu) v plazmě, moči i ve tkáních.

Nejprve je ve vzorku stanoven obsah volného silybinu. Poté je vzorek inkubován s β -glukuronidasou a sulfatasou, čímž je docíleno dekonjugace glukuronidů a sulfátů silybinu. Dekonjugace způsobí zvýšení koncentrace volného silybinu ve vzorku. Množství konjugovaného (sulfatovaného a glukuronidovaného) silybinu je vypočítáno z rozdílu mezi změřenou koncentrací volného silybinu a koncentrací volného silybinu po dekonjugaci [Wu 2007, Wen 2008].

Dekonjugační enzymy β -glukuronidasy a sulfatasy se získávají z různých organismů, například z *Helix pomatia*, *Escherichia coli*, *Aerobacter aerogenes* [Nakamura 2011].

2.5.3.1 β -Glukuronidasa

β -Glukuronidasa (EC 3.2.1.31) patří do skupiny hydrolas a působí jako katalyzátor při hydrolyze glukuronidů. Lidská β -glukuronidasa je produkována v mnoha tkáních (játra, ledviny, tenké střevo, placenta, plíce) [Paigen 1989]. Nachází se v endoplazmatickém retikulu a v lysosomech [Swank 1986].

Optimální pH pro činnost β -glukuronidasy se pohybuje v rozmezí 4,5–6,0 [Day 2000]. β -Glukuronidasa je stabilní vůči proteolýze [Wiener 1975] a v poměrně velkém rozmezí pH a teplot [Lin 1975].

2.5.3.2 Sulfatasa

Sulfatasy patří do třídy hydrolas a podtřídy esterasy. Katalyzují hydrolytické štěpení sulfát esterů, například steroidů, proteoglykanů, glykolipidů, mono- a disacharidů sulfátu. Mají širokou substrátovou specifitu [Hanson 2004].

Sulfatasy, zejména arylsulfatasy (EC 3.1.6.1), mají schopnost ovlivnit celou síť sulfatačních reakcí v buňkách [Kauffman 2004]. Působí při hormonální regulaci, modulaci buněčné signalizace, v rozvoji kostí a chrupavek a při hydrolytické degradaci zplodin buňky [Hanson 2004]. Arylsulfatasy jsou izolovány z trávicích šťáv hlemýždě zahradního (*Helix pomatia*). Optimální pH pro činnost arylsulfatasy z *Helix pomatia* se pohybuje v rozmezí 4–5 [Gibby 2004].

2.6 HPLC – základní charakteristiky

Vysokoučinná kapalinová chromatografie slouží k separaci složek vzorku a pro jeho kvalitativní i kvantitativní analýzu. HPLC lze použít v analytickém nebo preparativním (izolace jednotlivých složek směsi) měřítku.

Metoda je založena na rovnovážné distribuci složek vzorku mezi dvě fáze – mobilní a stacionární, mezi nimiž musí existovat fázové rozhraní. Při dělení dochází k opakovanému vytváření rovnovážných stavů separovaných látek mezi těmito fázemi. Pro dělení jednotlivých složek je tedy nutné, aby se lišily svými **distribučními konstantami** K_D , které charakterizují rozdělení složky mezi obě fáze. Distribuční konstantu lze vyjádřit rovnicí (1):

$$K_D = \frac{c_s}{c_m} \quad (1)$$

kde c_s je koncentrace složky ve stacionární fázi [mol.l^{-1}] a c_m koncentrace v mobilní fázi [mol.l^{-1}].

Zadržování rozpuštěné látky stacionární fází způsobuje, že separovaná látka migruje nižší rychlostí, než je rychlost mobilní fáze. Tato látka se v koloně pohybuje určitou dobu – **retenční čas** t_R [s] (2). Tato doba je součtem času stráveného v mobilní fázi – **mrtvý retenční čas** t_M [s] a času ve stacionární fázi – **redukovaný retenční čas** t'_R [s].

$$t_R = t_M + t'_R \quad (2)$$

Mrtvý retenční čas je retenční čas látky (inertu), která není v koloně zadržována a pohybuje se rychlostí mobilní fáze. Retenční čas inertu je pak totožný s mrtvým časem. Objem potřebný k eluci složky se nazývá **retenční objem** V_R [l] (3).

$$V_R = V_M + V'_R \quad (3)$$

kde V_M je **mrtvý retenční objem** [l] a V'_R **redukovaný retenční objem** [l]. Mobilní fáze protékající kolonou má určitý **objemový průtok** F [l.s^{-1}]. Mezi retenčním časem a retenčním objemem existuje vztah (4):

$$V_R = t_R \cdot F \quad (4)$$

Pro měření retenčních charakteristik se využívá **lineární rychlost** mobilní fáze v [m.s^{-1}], což je vzdálenost, kterou urazí mobilní fáze v koloně za jednotku času (5):

$$v = \frac{L}{t_M} \quad (5)$$

kde L je délka kolony [m] a t_M je mrtvý retenční čas [s].

Retenční čas a retenční objem jsou charakteristické veličiny pro každou separovanou látku v daném systému za daných podmínek. Tyto charakteristiky se používají ke kvalitativní analýze. Retence jednotlivých složek v koloně se téměř vždy vyjadřuje pomocí **retenčního faktoru** k , popř. pomocí retenčního objemu V_R (6). Pomocí retenčního faktoru lze vzájemně porovnávat retence analyzovaných látek, porovnávat různé analýzy a posuzovat vliv změn chromatografických podmínek na separaci.

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{t'_R}{t_M} \quad k = \frac{V_R - V_M}{V_M} = \frac{V'_R}{V_M} \quad (6)$$

Pokud je hodnota retenčního faktoru malá (pohybující se v jednotkách), jsou malé i eluční objemy a doba analýzy je kratší. Je-li retenční faktor vyšší než 20, jsou eluční objemy příliš velké a dochází k rozšiřování píků.

Selektivita chromatografického systému je definována jako relativní retence dvou sousedních látek. Vyjadřuje ji **separační faktor** (retenční poměr) α (7):

$$\alpha = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}} = \frac{k_2}{k_1} \quad (7)$$

Čím účinnější separace je, tím lépe se od sebe dělí jednotlivé složky směsi. Účinnost separace v kolonové chromatografii a rozmytí chromatografického píku je charakterizována počtem **teoretických pater** n . Počet teoretických pater n lze určit z chromatogramu z šířky píku v jeho základně Y [s] nebo z šířky píku v polovině jeho výšky $Y_{1/2}$ [s] a retenčního času t_R [s] podle vztahů (8) [Churáček 1984]:

$$n = 16 \left(\frac{t_R}{Y} \right)^2 \quad n = 5,545 \left(\frac{t_R}{Y_{1/2}} \right)^2 \quad (8)$$

Teoretické patro je pomyslná část kolony, ve které dochází k ustavení rovnováhy mezi mobilní a stacionární fází. Délka této části kolony se nazývá **výškový ekvivalent teoretického patra** H [m] (9):

$$H = \frac{L}{n} \quad (9)$$

Čím vyšší je počet teoretických pater a čím nižší je výškový ekvivalent teoretického patra, tím účinnější je separace složek. K rozšiřování zóny složky v koloně, a tím k růstu výškového ekvivalentu teoretického patra, vedou tyto děje: turbulentní difuze H_A , podélná molekulární difuze H_B , odpor proti přenosu hmoty ve stacionární fázi H_C a odpor proti přenosu hmoty v mobilní fázi H_D . Výsledný výškový ekvivalent teoretického patra je podle van Deemterovy teorie dán součtem těchto příspěvků (10):

$$H = H_A + H_B + H_C + H_D \quad (10)$$

Účinnost separace snižují mimokolonové prostory, jejichž vliv na rozmytí píků nelze zanedbat. Vlivy mimokolonových prostor jsou odečteny při výpočtu **skutečného výškového ekvivalentu teoretického patra kolony** H_{kol} [m] (11) [Horvath 1967]:

$$H_{kol} = L \frac{(Y_{1/2}^j - Y_{1/2}^e)^2}{5,545 (t_j - t_e)^2} \quad (11)$$

kde L je délka kolony [m], $Y_{1/2}^j$ je šířka píku v poloviční výšce [s], $Y_{1/2}^e$ je šířka píku v poloviční výšce [s] změřená bez kolony, t_j je retenční čas [s] a t_e retenční čas [s] měřený bez kolony.

Porovnávání účinnosti různých kolon a při různých experimentálních podmínkách je částečně možno na základě **redukovaného výškového ekvivalentu teoretického patra** h (12):

$$h = \frac{H_{kol}}{d_p} \quad (12)$$

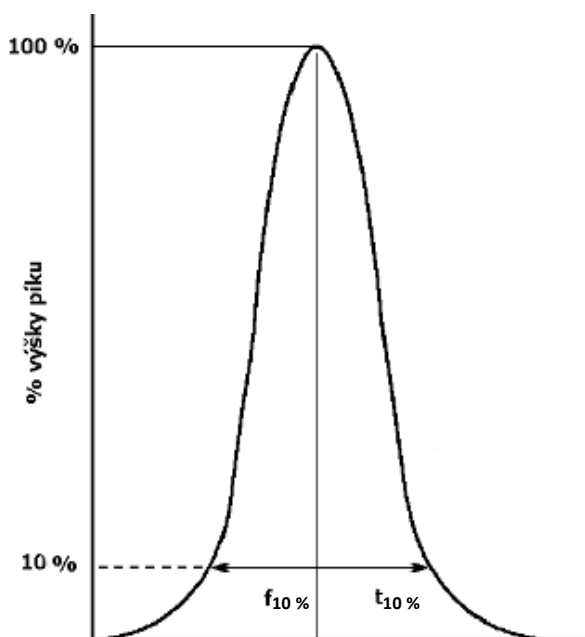
kde H_{kol} je skutečný výškový ekvivalent teoretického patra kolony [m] a d_p střední průměr částic [m] v koloně.

Vliv na účinnost kolony má také rychlost mobilní fáze. Tuto závislost popisuje van Deemterova křivka. Minimum křivky odpovídá optimální průtokové rychlosti, při které daná kolona vykazuje největší účinnost, a tedy minimální rozmytí zón analytů.

Kvalita chromatografické kolony má také vliv na symetrii píků. Asymetrie píku je nežádoucí, protože má negativní vliv na jeho integraci. Asymetrie píků se často vyjadřuje jako tzv. „tailing faktor“, který se počítá jako poměr šířky píku a dvojnásobku šířky vzestupné části píku v 5 % nebo 10 % jeho výšky (Obr. 10). Asymetrii píku v 10 % ($T_{10\%}$) jeho výšky je možno vypočítat podle rovnice (13):

$$T_{10\%} = \frac{f_{10\%} + t_{10\%}}{2f_{10\%}} \quad (13)$$

kde $f_{10\%}$ je přední část píku v 10 % jeho výšky [s] a $t_{10\%}$ je zadní část píku v 10 % jeho výšky [s].



Obr. 10 – Ilustrace rozdělení píku pro výpočet jeho asymetrie v 10 % jeho výšky [www.hplc.cz].

V případě, že je pík rozmýván („chvostuje“), pak je $T_{10\%}$ větší než 1. Pokud dochází k frontování píku, je $T_{10\%}$ menší než 1.

Vlastní separace složek je určena zvoleným chromatografickým systémem. Vhodným kritériem míry separace složek směsi je chromatografické **rozlišení** R_{ij} . Rozlišení dvou sousedních analytů lze určit z chromatogramu a je dáno vztahem (14) [Krejčí 1990]:

$$R_{ij} = \frac{2(t_{Rj} - t_{Ri})}{Y_j + Y_i} = \frac{1,177(t_{Rj} - t_{Ri})}{Y_{1/2,j} + Y_{1/2,i}} \quad (14)$$

kde t_{Rj} a t_{Ri} jsou retenční časy [s] pro uvažovanou dvojici solutů j (později eluovaná složka) a i na chromatogramu, Y_j , Y_i jsou šířky píků při základní linii [s], $Y_{1/2,j}$ a $Y_{1/2,i}$ jsou šířky píků v poloviční výšce [s]. Pro dvojici látek, jejichž píky se na záznamu významně neliší tvarem ani výškou, je rozlišení $R_{ij} = 1,0$ vyhovující. V případě náročných analýz může být požadována hodnota 1,5 a vyšší (farmacie).

Chromatografické rozlišení je ovlivněno **retenčním faktorem**, **účinností kolony** a její **selektivitou** [Churáček 1984]. Závislost rozlišení R_{ij} na jednotlivých faktorech je popsáno rovnicí (15):

$$R_{ij} = \frac{1}{4} \underbrace{\frac{\alpha_{ij}-1}{\alpha_{ij}}}_{\text{selektivita}} \underbrace{\frac{k_j}{1+k_j}}_{\text{retenční f.}} \underbrace{\sqrt{n_j}}_{\text{účinnost}} \quad (15)$$

kde α_{ij} je separační faktor pro uvažovanou dvojici solutů i (dříve eluovaná složka) a j (později eluovaná složka), n_j je účinnost kolony a k_j je retenční faktor později eluujícího píku.

Separační faktor je ovlivňován lineární rychlostí toku mobilní fáze, změnou složení mobilní fáze, její viskozitou (mění se s teplotou) a změnou stacionární fáze.

Retenční faktor je ovlivňován změnou složení mobilní fáze, její viskozitou (mění se s teplotou), změnou stacionární fáze a množstvím stacionární fáze v koloně, resp. velikostí kolony.

Účinnost je ovlivňována lineární rychlostí toku mobilní fáze, délkou kolony, vlastnostmi stacionární fáze v koloně, viskozitou mobilní fáze (mění se s teplotou) a mimokolonovými prostory.

2.6.1 Chromatografický systém

Ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii se využívá nepolárních i polárních stacionárních fází. U **normálního rozdělení** chromatografického systému se jako stacionární fáze využívají polární látky – nejčastěji silikagel a oxid hlinitý. Jako mobilní fáze se uplatňují nepolární rozpouštědla (hexan, heptan, dichlormethan), ke kterým se přidávají polární modifikátory (alkoholy, acetonitril, tetrahydrofuran).

U **reverzního uspořádání** je nejčastějším nosičem stacionární fáze silikagel, na jehož povrchových silanolových skupinách je navázán vhodný ligand – např. oktadecylový uhlíkový řetězec (-C18), oktylový uhlíkový řetězec (-C8), kyanoskupina (-CN), methyl, fenyl a další. Na této fázi lze v kombinaci s mobilní fází obsahující vodu (nebo pufovací roztok) a organický modifikátor (methanol, ethanol, acetonitril, aceton, tetrahydrofuran) separovat nepolární látky, látky polarizovatelné a slabé kyseliny a báze, jestliže se jejich disociace částečně nebo úplně potlačí vhodnou úpravou pH. Reverzní systémy patří mezi nejpoužívanější v HPLC (cca 80 % všech aplikací), protože mají řadu výhod: selektivitu reverzního systému lze snadno ovlivnit

složením mobilní fáze a změnou stacionární fáze, ustanovování rovnováhy v koloně je rychlé a metoda je celkově experimentálně jednoduchá.

Vysokých účinností separačního procesu se v konvenční HPLC dosahuje použitím stacionárních fází tvořených pravidelnými kulovitými neporézními částicemi jednotné velikosti (3-5 μm), které homogenně vyplňují kolonu.

Vývoj technologie částic se v posledních letech (cca od roku 2009) soustředil na využití tzv. „core-shell“ stacionárních fází. Tyto částice jsou složené z pevného neporézního jádra (obvykle oxid křemičitý) a homogenního porézního obalu. Tato struktura umožňuje mobilní fázi procházet pouze skrz porézní část. Dosáhne se tak snížení tlakového spádu na koloně a současně se může využít vyšších průtoků mobilní fáze a tudíž zrychlení separace při zachování její vysoké účinnosti.

Kompaktnější zaplnění prostoru v koloně nabízejí monolitické stacionární fáze, kdy je kolona zcela vyplněna polymerem o definované pórovitosti. Tato struktura umožňuje provádění analýz při vysokých rychlostech mobilní fáze a zároveň bez ztráty separační účinnosti. Monolitické kolony poskytují rychlejší analýzy za nižších tlaků, než je tomu u náplňových kolon.

V HPLC lze látky eluovat mobilní fází o konstantním složení (isokratická eluce) nebo mobilní fází o proměnném složení (gradientová eluce). Při gradientové eluci se kontinuálně nebo skokově mění eluční síla mobilní fáze, a je proto vhodná pro látky s velkými rozdíly v retenčních faktorech. Nejpoužívanější je lineární gradient – kontinuální zvyšování koncentrace eluentu s vyšší eluční silou v eluentu s nižší eluční silou [Štulík 2004].

Dávkuje se malá množství vzorků (v konvenční HPLC řádově μl , v UHPLC menší objemy) a k detekci jsou nutné citlivé detektory umožňující kontinuální monitorování látek na výstupu z kolony. Detektory lze rozdělit na univerzální (měří vlastnosti systému jako celku, tj. tepelnou vodivost, index lomu, relativní permitivitu) a selektivní (měří např. absorbanci při určité vlnové délce). Selektivní detekce je citlivější a vhodnější při analýzách složek přítomných v komplikovaných maticích. Mezi běžně používané detektory v HPLC patří spektrofotometrické, fluorimetrické, refraktometrické, hmotnostní a elektrochemické.

2.6.2 Limit detekce a limit stanovitelnosti

Úkolem kvantitativního stanovení daného analytu je nalezení vztahu mezi plochou nebo výškou píku a množstvím eluované látky.

Limit detekce (LOD – limit of detection) odpovídá koncentraci, pro kterou je analytický signál statisticky významně odlišný od šumu. **Limit stanovitelnosti** (LOQ – limit of quantification) odpovídá koncentraci, při které je přesnost stanovení taková, že dovoluje kvantitativní vyhodnocení.

V separačních metodách se limit detekce vyjadřuje jako trojnásobek šumu základní linie a limit stanovitelnosti jako desetinásobek šumu základní linie (16) [Krejčí 1990]:

$$LOD = \frac{3 \cdot h_n}{m} \qquad LOQ = \frac{10 \cdot h_n}{m} \qquad (16)$$

kde h_n je šum na základní linii a m je směrnice kalibrační křivky. Šumem se rozumí změny a fluktuace výstupního signálu detektoru, které nejsou nositeli informace o složení eluentu.

2.6.3 Technika vyhodnocování

Při kvantitativním způsobu vyhodnocování se většinou používají tyto metody: metoda vnějšího standardu, standardního přídávku, vnitřního standardu (dvě varianty: přímého pozorování a kalibrační přímky) a vnitřní normalizace.

V této studii byla používána metoda vnitřního standardu (IS), varianta přímého pozorování. Předností této techniky je, že se celá analýza uskuteční z jediného nástřiku a objem dávkovaného vzorku není nutné znát zcela přesně. Analyzovaný vzorek je ředěn vzorkem vnitřního standardu, přičemž koncentrace a objem přidaného vnitřního standardu musí být známy. Podmínkou je, že látka přidaná jako IS nesmí být přítomna v původním vzorku, nesmí reagovat se žádnou složkou směsi a musí poskytovat dobře vyhodnotitelný signál, dostatečně separovaný od ostatních signálů v chromatogramu. Rovněž fyzikálně-chemické vlastnosti IS a sledovaného analytu by měly být podobné. Všechny uvedené požadavky pro použití techniky IS byly v této práci splněny.

Ke vzorku o neznámé koncentraci c_i [mol.l⁻¹] a o známém objemu V_i [l] se přidá definovaný objem standardu V_s [l] o známé koncentraci c_s [mol.l⁻¹]. Směs se nadávkuje a vyhodnotí se plochy (integrál změny koncentrace solutu v eluentu s časem) píku standardu A_s a píku stanovované látky A_i . Koncentrace vzorku se vypočítá podle rovnice (17) [Krejčí 1990]:

$$C_i = \frac{V_s}{V_i} \frac{A_i}{A_s} C_s \quad (17)$$

Tato technika je výhodná především v případech, kdy se nastříknutý objem obtížně stanovuje nebo předchází-li nástřiku úprava vzorku, při níž se vzorek ředí nebo se k němu přidávají další složky.

2.6.4 Přehled HPLC metod stanovení silybinu

V tabulce 2 jsou uvedeny HPLC metody použité ve studiích zabývajících se stanovením silybinu. Převážně byla využívána isokratická eluce, UV detekce a kvantifikace metodou vnitřního standardu (IS) či kalibrační přímkou. Většina stanovení silybinu byla provedena s využitím oktadecylové stacionární fáze v reverzním separačním systému.

Tab. 2 – Přehled HPLC metod stanovení silybinu.

stacionární fáze	mobilní fáze	eluce	kvantifikace detekce	citace
C18, 3 μm	CH ₃ OH/NaH ₂ PO ₄ pH 3 (60/40; v/v)	isokratická	IS: naringenin a hesperetin, UV	[Rickling 1995]
C18, 5 μm	A: CH ₃ OH /H ₂ O/CH ₃ COOH (37/63/0,5; v/v/v) B: CH ₃ OH	gradientová	kalibrační přímka, UV	[Kosina 2000]
C18, 5 μm	20 mM KH ₂ PO ₄ / CH ₃ OH (50/50; v/v)	isokratická	IS: naringenin, UV	[Kim 2003b]
C18, 5 μm	CH ₃ CN/ CH ₃ OH /H ₂ O (2,4/45/52,6; v/v/v)	isokratická	UV, MS	[Han 2004]
C18, 5 μm	A: 5 mM CH ₃ COONH ₄ pH 4 (okys. HCOOH) B: CH ₃ OH /H ₂ O/HCOOH (95/5/0,1; v/v/v)	gradientová	ESI-MS	[Lee 2006]
C18, 3 μm	A: H ₂ O/CH ₃ COOH (19/1; v/v) B: CH ₃ OH /CH ₃ COOH (19/1; v/v)	gradientová	IS: apigenin, UV	[Hoh 2007]
C18, 5 μm	CH ₃ CN /10 mM NaH ₂ PO ₄ pH 5,45 (50/50; v/v)	isokratická	IS: naringenin, UV	[Wu 2007]
C18, 5 μm	CH ₃ OH /H ₂ O (50/50; v/v) 0,1 % HCOOH	isokratická	IS: naringin, UV, MS	[Li 2008]
C18, 3 μm	CH ₃ OH /1% HCOOH (44/56; v/v)	isokratická	kalibrační přímka, ESI-MS	[Wen 2008]
C18 monolit	CH ₃ OH /5 mM NaH ₂ PO ₄ (45/55; v/v) pH 2,75; okys. H ₃ PO ₄	isokratická	kalibrační přímka, UV	[Hadad 2009]
C18, 5 μm	CH ₃ OH /2% CH ₃ COOH (48/52; v/v)	isokratická	IS: 1-naftol, UV	[Jia 2010]
C18 monolit	CH ₃ CN / CH ₃ OH /H ₂ O/CF ₃ COOH (2/37/61/0,05; v/v/v/v)	isokratická	kalibrační přímka, UV	[Marhol 2011]
C18; 2,6 μm core-shell				

3 Experimentální část

3.1 Použité chemikálie

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

Silybin A (d. e. > 99, 4 %) – z laboratorních zásob [Gažák 2010], Praha, Česká republika

Silybin B (d. e. > 99, 6 %) – z laboratorních zásob [Gažák 2010], Praha, Česká republika

Voda (ultračistá), Watrex Ultrapur, Praha, Česká republika

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

Methanol (gradient grade), J. T. Baker, Deventer, Nizozemsko

Acetonitril (gradient grade), J. T. Baker, Deventer, Nizozemsko

Kyselina octová (p. a.), Lach-Ner, Neratovice, Česká republika

Kyselina mravenčí (≥ 99 %), Merck, Darmstadt, Německo

Thiomočovina (purum), Lachema, Brno, Česká republika

Octan sodný (purum), Lachema, Brno, Česká republika

β -Glukuronidasa z *Helix pomatia*, Typ H-1, 1 926 000 U/g, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Sulfatasa z *Helix pomatia*, Typ H-1, 15 970 U/g, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

3.2 Použitý biologický materiál a jeho skladování

Plazma získaná z potkanů kmene Wistar byla skladována při -70 °C. Před zpracováním byla ponechána při laboratorní teplotě 15 minut.

3.3 Použité přístroje a vybavení

Vakuová rotační odparka (Heidolph, Schwabach, Německo)

Pipety (Eppendorf Research, Hamburk, Německo)

Centrifuga 5804 R (Eppendorf Research, Hamburk, Německo)

Centrifuga mini spin plus (Eppendorf Research, Hamburk, Německo)

Vortex PV-1 (Grand-bio, Anglie)

Analytické laboratorní váhy AE 200 (Mettler-Toledo, Švýcarsko)

Váhy (Bel Engineering, Monza, Itálie)

Termomixer (Thermomixer comfort – Eppendorf Research, Hamburk, Německo)
Chemické nádobí (Simax, Sázava, Česká republika)

3.3.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Měření bylo prováděno na kapalinovém chromatografu Shimadzu Prominence UFLC systém (Kyoto, Japonsko) složeném z odplynovače mobilní fáze DGU-20A, dvou vysokotlakých čerpadel LC-20AD, termostatovaného autosampleru SIL-20ACH, kolonového termostatu CTO-10ASvp a UV-VIS detektoru diodového pole SPD-M20A. Sběr a vyhodnocení dat bylo provedeno softwarem *LC Solution* (Shimadzu, Kyoto, Japonsko).

Testované stacionární fáze: monolitická kolona Chromolith[®] Performance RP-18e (100×3 mm; id) (Merck, Darmstadt, Německo) a náplňová kolona Gemini C18 (150×4,6 mm; id; 5 μm) (Phenomenex, Torrance, USA). Při analýzách biologického materiálu byla použita předkolona Chromolith RP-18e (10×4,6 mm; id) (Merck, Darmstadt, Německo).

Mobilní fáze měla složení CH₃CN/CH₃OH/H₂O/HCOOH (2/37/61/0,1; v/v/v/v). Měření byla prováděna při teplotě 25 °C a detekce v rozmezí 200-450 nm, sledován a vyhodnocován byl signál při vlnové délce 285 nm.

3.4 Použité metody

3.4.1 Studie *in vivo* - farmakokinetika diastereoisomerů silybinu A a B

Potkanům kmene Wistar (všichni samci) o hmotnosti 290 až 338 g (průměrná hmotnost 304 g, směrodatná odchylka 16 g) byl intragastrickou sondou dávkován silybin A nebo silybin B ve fyziologickém roztoku. Koncentrace silybinu byla 60 mg na 2 ml fyz. roztoku, což odpovídá cca 200 mg.kg⁻¹ silybinu.

V jednotlivých časových bodech (0,5 h; 1 h; 1,5 h; 2 h; 3 h; 4 h; 6 h) po podání silybinu byla potkanům odebrána krev do EDTA (57 µl EDTA na 1 ml krve). Krev byla centrifugována a plazma ihned uložena do -70 °C.

Pro každý časový bod byla využita **3** zvířata (silybin **A**) a **2** zvířata (silybin **B**). Pro kontrolní vzorky plazmy byla využita další 4 zvířata, kterým nebyl dávkován žádný silybin. Veškeré práce se zvířaty pováděl Doc. MUDr. Večeřa PhD. z katedry farmakologie, LF UP v Olomouci v souladu s etickým kodexem pro práci s laboratorními zvířaty platnými na Univerzitě Palackého.

3.4.2 Příprava mobilních fází a zásobních roztoků

Mobilní fáze o složení CH₃CN/CH₃OH/H₂O/HCOOH byla vždy připravována smícháním daných objemových dílů rozpouštědel (2/37/61/0,1; v/v/v/v) a před HPLC analýzou byla přefiltrována přes 0,45 µm nylonový membránový filtr (Whatman, Anglie).

Zásobní roztoky silybinu A a B o hmotnostní koncentraci 50 µg.ml⁻¹ byly připraveny každý zvlášť, rozpuštěním příslušného množství silybinu A nebo silybinu B v methanolu a skladovány bez přístupu světla při -18 °C. Roztoky o nižších hmotnostních koncentracích byly připravovány ředěním zásobních roztoků ultračistou vodou a byly skladovány bez přístupu světla při 8 °C.

3.4.3 Příprava vzorků pro stanovení volného silybinu

Vzorek plazmy byl před HPLC analýzou upraven následovně: plazma byla promíchána pomocí vortexu (vortex, 1 min). K 700 μl plazmy bylo přidáno 50 μl vnitřního standardu silybinu A nebo silybinu B o koncentraci 8 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, (vortex, 1 min). Poté byl k plazmě přidán ledový aceton (14 ml), (vortex, 1 min). Následně byly v takto upraveném vzorku denaturovány proteiny (30 min, $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$). Vzorek byl po 15 minutách promíchán. Během tohoto procesu byly rovněž sledované analyty extrahovány do acetonu.

Poté byl vzorek centrifugován (10 min, 4 500 otáček za minutu (rpm), $10\text{ }^{\circ}\text{C}$). Supernatant byl ze vzorku odebrán a za sníženého tlaku odpařen do sucha při teplotě $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Sledované analyty se na sraženině proteinů nezachytávaly, což bylo experimentálně ověřeno.

Odparek byl rozpuštěn ve 150 μl 40% methanolu, centrifugován (5 min, 12 000 rpm) a následně chromatografován.

3.4.4 Příprava vzorků pro stanovení celkového silybinu

Plazma byla promíchána (vortex, 1 min). K 700 μl plazmy bylo pro dekonjugaci glukuronidů a sulfátů silybinu přidáno 500 μl roztoku enzymu β -glukuronidasy (aktivita $1700\text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$) a 500 μl roztoku enzymu sulfatasy (aktivita $170\text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$), oba v acetátovém pufru (pH 5; $0,2\text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Výsledné aktivity enzymů v roztoku byly $500\text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$ β -glukuronidasy a $50\text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$ sulfatasy. Plazma s enzymy byla inkubována v termomixéru (2 h, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 600 rpm).

Dále bylo ke vzorku přidáno 50 μl vnitřního standardu silybinu A nebo silybinu B o hmotnostní koncentraci 8 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, (vortex, 1 min). Poté byl k plazmě přidán ledový aceton (20 ml), (vortex, 1 min) a následně byl vzorek upraven stejným postupem jako v kapitole 3.4.3. Přidání vnitřního standardu před přidávkem enzymů nemělo vliv na míru hydrolyzy konjugátů silybinu, což bylo experimentálně ověřeno.

4 Výsledky a diskuze

4.1 Určení chromatografických parametrů analytických kolon

Pro stanovení diastereoisomerů silybinu byly porovnány dvě chromatografické kolony. Byly zvoleny dva rozdílné koncepty stacionárních fází na bázi silikagelu v reverzním módu: náplňová kolona Gemini C18 (150×4,6 mm; id; 5 μm) a monolitická kolona Chromolith Performance C18 (100×3 mm; id).

Dle dostupných literárních údajů byly dosud pro stanovení diastereoisomerů silybinu nejčastěji využívány náplňové kolony C18 s velikostí částic 5 μm nebo 3 μm (Tab. 2, str. 41).

Pro srovnání vhodnosti kolon ke kvalitativnímu i kvantitativnímu stanovení diastereoisomerů silybinu byly proměřeny jejich základní chromatografické parametry, na jejichž základě byly kolony porovnány.

Byl připraven roztok obsahující 5 μg.ml⁻¹ silybinu A, 5 μg.ml⁻¹ silybinu B a 25 μg.ml⁻¹ thiomočoviny v 50% methanolu. Poté byl tento roztok dávkován na HPLC při průtocích mobilní fáze (*F*) v rozmezí 0,1 – 1,9 ml.min⁻¹ o složení CH₃CN/CH₃OH/H₂O/HCOOH (2/37/61/0,1; v/v/v/v). Nástřik byl vždy 25 μl a každé měření bylo provedeno v tripletu pro monolitickou i pro náplňovou kolonu při teplotě 25 °C. Byl sledován tlak na koloně (*p*), retenční časy jednotlivých analytů (*t_R*), šířka píků v polovině výšky (*Y_{1/2}*) a celkový čas analýzy (*t_{celk}*).

Diastereoisomerní pár (silybin A a silybin B) představuje z hlediska chromatografického rozlišení klíčový problém dané analýzy, který je nutno vzhledem k odlišným biologickým vlastnostem diastereoisomerů silybinu (kap. 2.4.4) vyřešit. Z naměřených dat byl vypočítán retenční faktor (*k*), separační faktor (*α*), rozlišení píků silybinu A a silybinu B (*R*), skutečný výškový ekvivalent teoretického patra kolony (*H_{kol}*) a parametr asymetrie píků v 10 % výšky píku (*T_{10%}*).

Pro uvedené výpočty bylo nezbytné změřit mrtvý retenční čas (*t_M*). V případě RP-HPLC se používají polární látky, jako jsou např. thiomočovina či uracil. V této práci byl mrtvý retenční čas měřen s využitím thiomočoviny.

4.1.1 Vliv lineární rychlosti mobilní fáze na účinnost kolony

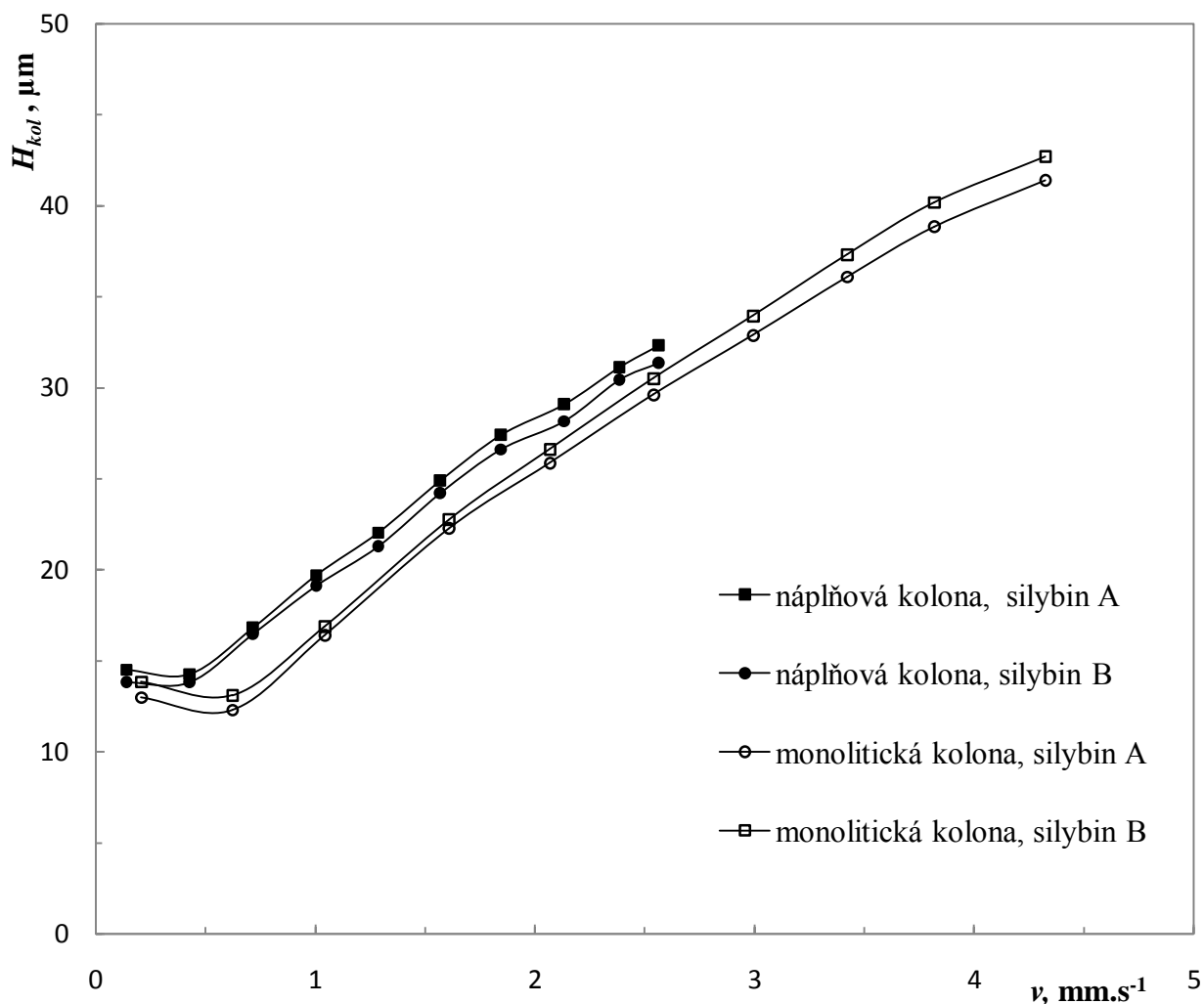
Účinnost kolony je závislá na průtoku mobilní fáze (resp. na lineární rychlosti mobilní fáze). Počet teoretických pater kolony se s rostoucí lineární rychlostí mobilní fáze snižuje a výškový ekvivalent teoretického patra se zvyšuje – účinnost kolony klesá.

Na účinnost kolony mají nezanedbatelný vliv mimokolonové prostory (objem nástřikového zařízení, spojovacích kapilár, objem cely detektoru), které velmi výrazně přispívají k rozšiřování píku analytu. Vliv mimokolonových prostor byl zjištěn tak, že analýza roztoku silybinu A o hmotnostní koncentraci $5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ byla opět provedena v tripletu pro průtoky mobilní fáze $0,1 - 1,9 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$; tentokrát však bez analytické kolony. Kolona byla nahrazena spojkou s (téměř) nulovým objemem.

Z těchto měření byly získány píky silybinu A na jejichž rozmytí měly vliv pouze mimokolonové prostory. Z retenčních časů silybinu A a šířek píků silybinu A v polovině jejich výšky získaných z analýz s kolonou a bez kolony byl vypočítán skutečný výškový ekvivalent teoretického patra kolony H_{kol} (rovnice 11, str. 35) pro silybin A.

Jelikož se retenční čas a šířka píku v polovině jeho výšky pro silybin A měřené bez kolony nelišila od těchto hodnot naměřených pro silybin B bez kolony, bylo k výpočtu parametru H_{kol} pro silybin B využito dat získaných z analýz roztoku silybinu A (bez kolony) a dále retenční čas a šířka píku v polovině jeho výšky pro silybin B naměřené s kolonou.

Závislost parametru H_{kol} (pro silybin A a silybin B) na lineární rychlosti mobilní fáze zobrazují van Deemterovy křivky (Obr. 11).



Obr. 11 – Závislost skutečného výškového ekvivalentu teoretického patra monolitické (100×3 mm; Chromolith Performance C18) a náplňové kolony (150×4,6 mm; Gemini C18; 5 μm) na lineární rychlosti mobilní fáze o složení CH₃CN/CH₃OH/H₂O/HCOOH (2/37/61/0,1; v/v/v/v).

Na křivce jsou patrná minima při lineární rychlosti mobilní fáze 0,6 mm.s⁻¹ pro monolitickou kolonu a 0,4 mm.s⁻¹ pro náplňovou kolonu. Při této lineární rychlosti mají kolony nejvyšší účinnost – zóny analytů jsou nejméně rozmývány. Skutečný výškový ekvivalent teoretického patra H_{kol} v minimu byl pro monolitickou kolonu 12,3 μm (silybin A) a 13,1 μm (silybin B); pro náplňovou kolonu 14,3 μm (silybin A) a 13,8 μm (silybin B).

Porovnání účinnosti těchto kolon bylo provedeno na základě redukováného výškového ekvivalentu teoretického patra h . Z van Deemterových křivek (Obr. 11) je patrné, že minimální skutečný výškový ekvivalent teoretického patra kolony H_{kol} byl pro testovanou náplňovou

kolonu při lineární rychlosti mobilní fáze $0,43 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$ (průtoku $0,3 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$). Tomuto bodu odpovídá $h_{min} = 2,9$ ($d_p = 5 \text{ }\mu\text{m}$, vypočítaný z rovnice 12, str. 35) pro silybin A a $h_{min} = 2,8$ pro silybin B.

Výpočet redukovaného výškového ekvivalentu teoretického patra pro monolitické kolony je obtížnější, jelikož tyto kolony nejsou naplněny částicemi. K výpočtu se místo středního průměru částic d_p využívá převážně parametr d_{skel} , což je průměr skeletu monolitu (skeleton diameter) [Minakuchi 1997, Kobayashi 2006]. Hodnotu d_{skel} většinou udává výrobce nebo se musí zjistit experimentálně. Redukovaný výškový ekvivalent teoretického patra h pro monolitickou kolonu je možno vypočítat z rovnice (18):

$$h = \frac{H_{kol}}{d_{skel}} \quad (18)$$

U testované monolitické kolony měl parametr d_{skel} hodnotu $2 \text{ }\mu\text{m}$. Minimální H_{kol} byl při lineární rychlosti mobilní fáze $0,62 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$ (průtoku $0,3 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$). Tomuto bodu odpovídá $h_{min} = 6,1$ pro silybin A a $h_{min} = 6,6$ pro silybin B.

Z naměřených a vypočítaných dat vyplývá, že vyšší účinnost měla náplňová kolona, jelikož její minimální redukovaný výškový ekvivalent teoretického patra byl méně než poloviční oproti monolitické koloně. Při průtoku mobilní fáze $0,3 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ byl počet teoretických pater (pro silybin A) u náplňové kolony $85\,500/\text{m}$, u monolitické kolony $53\,800/\text{m}$.

4.1.2 Rozlišení a selektivita kolony

Naměřený **retenční faktor** (k) pro monolitickou kolonu získaný jako průměr ze třiceti měření byl 6,6 (silybin A) a 8,0 (silybin B); pro náplňovou kolonu 20,9 (silybin A) a 24,7 (silybin B). V náplňové koloně byly tedy analyty při isokratické eluci zadržovány zhruba $3\times$ déle než na monolitické koloně.

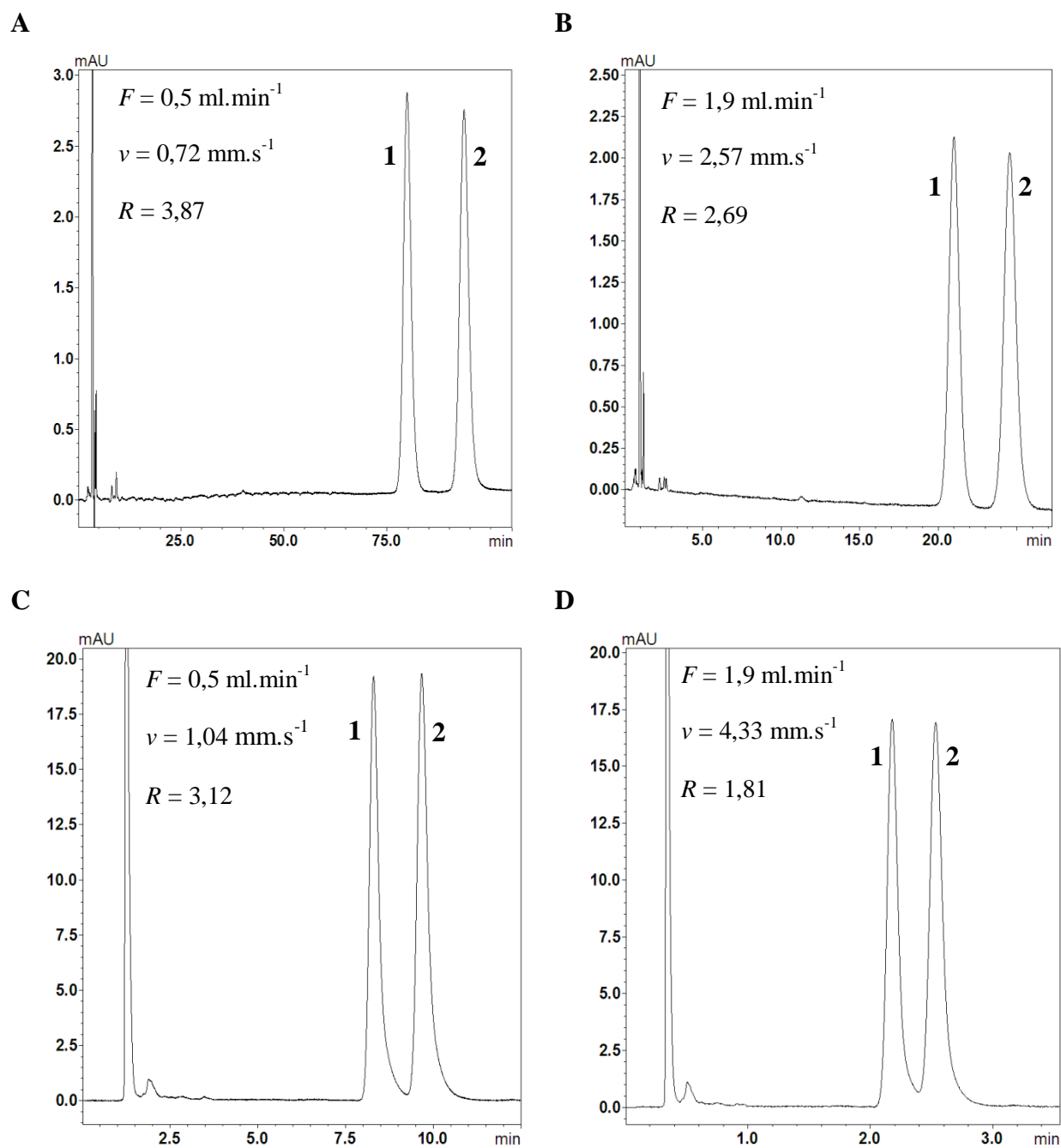
Hodnota **separačního faktoru** (selektivity) pro monolitickou kolonu byla $\alpha = 1,21$ a pro náplňovou kolonu $\alpha = 1,18$. Faktor selektivity má velký vliv na rozlišení analytů, což je patrné z rovnice 14 (str. 36). Z tohoto pohledu se monolitická kolona jeví lepší, protože má větší selektivitu.

Rozlišení píků silybinu A a silybinu B je na lineární rychlosti mobilní fáze (průtoku) výrazně závislé. Čím je lineární rychlost mobilní fáze vyšší, tím je rozlišení píků nižší, avšak analýza kratší (Obr. 12).

U monolitické kolony rozlišení signálů silybinu A a silybinu B pokleslo o 65 %, z hodnoty 5,11 na 1,81 při vzrůstající lineární rychlosti mobilní fáze $0,21 - 4,33 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$ (průtoku $0,1 - 1,9 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$), a čas se zkrátí ze 75 minut na 4 minuty (pokles o 95 %).

Při použití náplňové kolony rozlišení pokleslo o 33 %; z hodnoty 4,03 na 2,69, při vzrůstající lineární rychlosti mobilní fáze $0,14 - 2,57 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$ (průtoku $0,1 - 1,9 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$), a čas se zkrátí ze 450 minut na 27 minut (pokles o 94 %).

Náplňová kolona poskytovala lepší rozlišení signálů silybinu A a silybinu B při lineárních rychlostech mobilní fáze $0,43 - 2,57 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$ (průtoku $0,3 - 1,9 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$).



Obr. 12 – Chromatogramy separace standardních roztoků diastereoisomerů silybinu při průtocích mobilní fáze 0,5 a 1,9 ml.min⁻¹. Složení mobilní fáze: CH₃CN/CH₃OH/H₂O/HCOOH (2/37/61/0,1; v/v/v/v), nástřik 25 μl, detekce λ = 285 nm.

A, B - náplňová kolona (150×4,6 mm; Gemini C18; 5 μm)

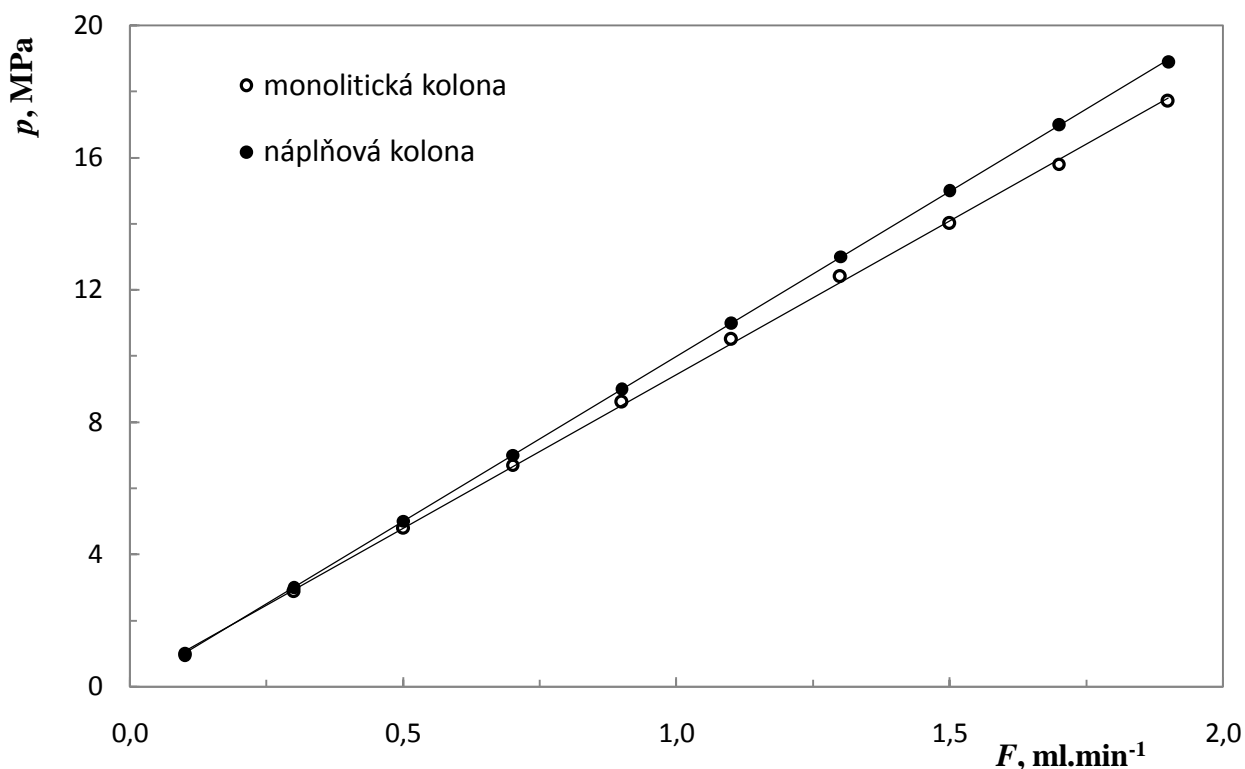
C, D - monolitická kolona (100×3 mm; Chromolith Performance C18)

Analyty: **1** – silybin A (5 μg.ml⁻¹); **2** – silybin B (5 μg.ml⁻¹)

4.1.3 Další parametry analýz na testovaných kolonách

Asymetrie píků $T_{10\%}$, charakterizující rozmývání píků, byla vyšší u monolitické kolony, kde průměrná hodnota $T_{10\%}$ získaná ze třiceti měření byla 1,31 (silybin A) a 1,39 (silybin B). U náplňové kolony byla asymetrie píků nižší - 1,10 (silybin A) a 1,09 (silybin B). Rozmývání („chvostování“) píků je nežádoucí jev. V případě monolitické kolony je vyšší asymetrie signálů způsobena radiální heterogenitou stacionární fáze [Abia 2009]. Bylo pozorováno, že na asymetrii píků nemá lineární rychlost mobilní fáze žádný vliv.

Obě kolony při stejných průtocích mobilní fáze vykazovaly srovnatelný tlakový spád (Obr. 13), poněkud nižší pro monolitickou kolonu. To je možno vysvětlit tím, že náplňová kolona měla výrazně větší rozměry (150×4,6 mm; id) než monolitická kolona (100×3 mm; id). Tlakový limit udávaný výrobcem pro testovanou monolitickou kolonu byl 20 MPa, nejvýše dosažený tlak byl mírně pod tímto limitem.



Obr. 13 – Závislost tlaku v systému na průtoku mobilní fáze o složení $\text{CH}_3\text{CN}/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}/\text{HCOOH}$ (2/37/61/0,1; v/v/v/v) pro monolitickou (100×3 mm; Chromolith Performance C18) a náplňovou kolonu (150×4,6 mm; Gemini C18; 5 μm).

4.1.4 Limit detekce a limit stanovitelnosti

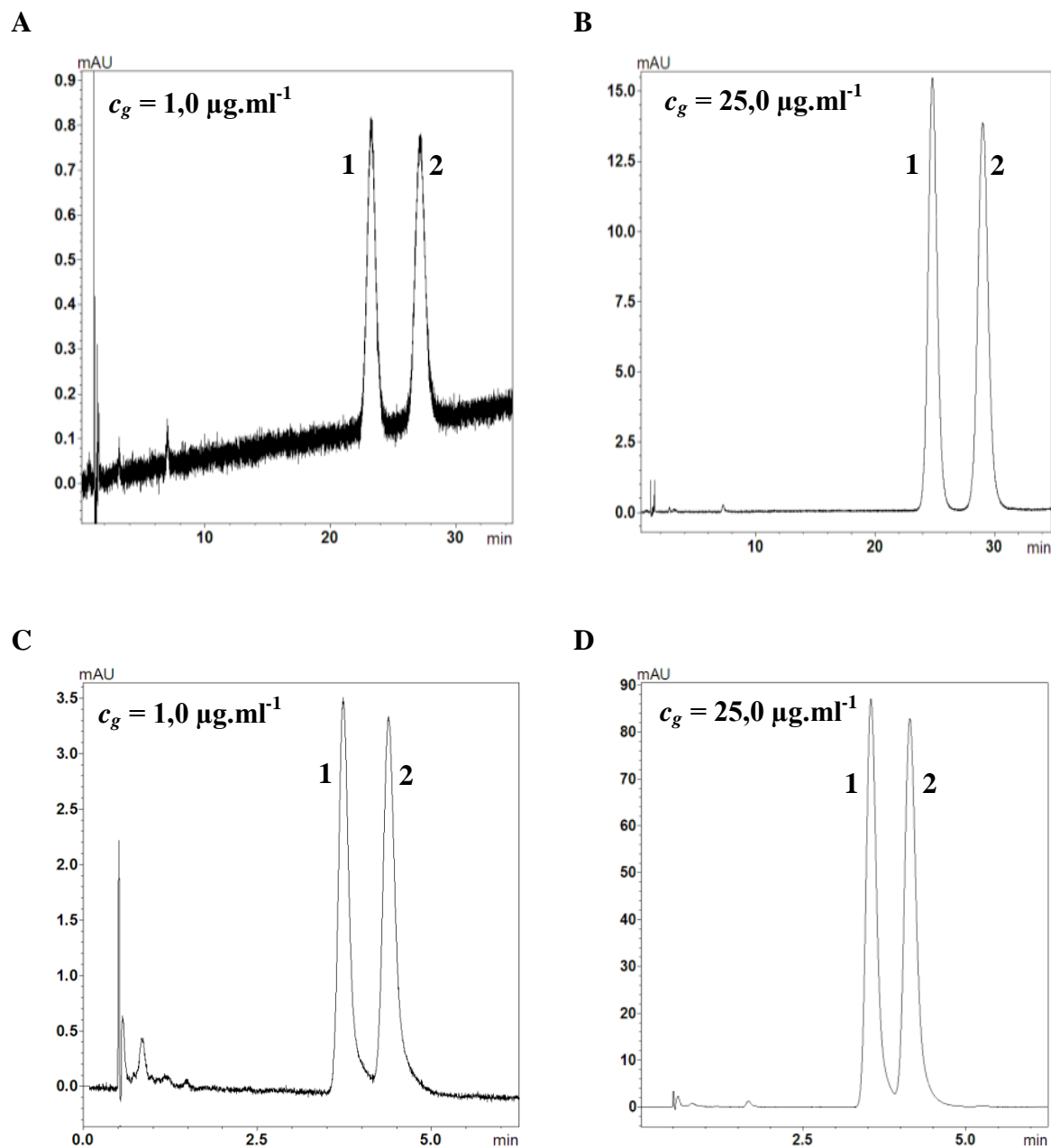
Byly připraveny roztoky silybinu A a silybinu B (v 50% methanolu) o hmotnostních koncentracích 0,1; 1,0; 5,0; 10,0 a 25,0 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Roztoky byly v tripletu analyzovány pomocí HPLC při použití mobilní fáze o složení $\text{CH}_3\text{CN}/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}/\text{HCOOH}$ (2/37/61/0,1; v/v/v/v), nástřík byl 25 μl vzorku. Pro monolitickou kolonu byl zvolen průtok mobilní fáze 1,2 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$, pro náplňovou kolonu 1,5 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Stanovení byla provedena při teplotě 25 $^{\circ}\text{C}$.

Z naměřených výšek píků byly sestaveny kalibrační přímky. Ze směrnice přímek a změřeného šumu byly podle rovnic (16, str. 39) vypočítány limity detekce a limity stanovitelnosti (Tab. 3) pro silybin A a B. Šířka šumu při analýze na náplňové koloně (0,05 mAU) byla vyšší než při analýze na monolitické koloně (0,04 mAU). To bylo pravděpodobně způsobeno většími rozměry náplňové kolony a tím, že v této koloně jsou mezi částicemi náplně póry různé velikosti.

Limit detekce i limit stanovitelnosti byly u monolitické kolony přibližně 7 \times nižší než u náplňové kolony (Tab. 3 a Obr. 14).

Tab. 3 – Rovnice lineární regrese, korelační koeficienty, limit detekce a limit stanovitelnosti pro silybin A a silybin B při analýze náplňovou (150 \times 4,6 mm; Gemini C18; 5 μm) a monolitickou kolonou (100 \times 3 mm; Chromolith Performance C18).

	Náplňová kolona		Monolitická kolona	
	silybin A	silybin B	silybin A	silybin B
Lineární regrese	$y = 0,577x + 0,070$	$y = 0,507x + 0,186$	$y = 3,474x + 0,344$	$y = 3,252x + 0,704$
Korelační koeficient R^2	0,9998	0,9997	0,9981	0,9974
LOD $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	0,26	0,30	0,04	0,04
LOQ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	0,87	0,99	0,12	0,12



Obr. 14 – Porovnání intenzit odezvy signálu silybinu A a silybinu B pro hmotnostní koncentrace 1,0 a 25,0 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Složení mobilní fáze $\text{CH}_3\text{CN}/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}/\text{HCOOH}$ (2/37/61/0,1; v/v/v/v), nástřik 25 μl , detekce $\lambda = 285 \text{ nm}$.

A, B – náplňová kolona (150×4,6 mm; Gemini C18; 5 μm), průtok 1,5 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ ($v = 2,13 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$)

C, D – monolitická kolona (100×3 mm; Chromolith Performance C18), průtok 1,2 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ ($v = 3,42 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$)

Analyty: **1** – silybin A, **2** – silybin B.

4.1.5 Srovnání separace a detekce na jednotlivých kolonách

V této práci byly porovnávány dvě koncepčně zcela odlišné stacionární fáze v reverzním módu – náplňová kolona Gemini C18; 150×4,6 mm; 5 μm a monolitická kolona Chromolith Performance C18; 100×3 mm. Náplňová kolona vykazovala vyšší účinnost při separacích diastereoisomerů silybinu ($h_{min} = 2,9$ silybin A; $h_{min} = 2,8$ silybin B; $v = 0,43$ mm.s⁻¹) než monolitická ($h_{min} = 6,1$ silybin A; $h_{min} = 6,6$ silybin B; $v = 0,62$ mm.s⁻¹) a zároveň poskytovala lepší rozlišení jednotlivých analytů při průtocích mobilní fáze 0,3 – 1,9 ml.min⁻¹ (lineární rychlosti 0,43 – 2,57 mm.s⁻¹).

Selektivita náplňové kolony pro diastereoisomery silybinu byla nižší ($\alpha = 1,18$) než u monolitické kolony ($\alpha = 1,21$).

Separace na obou kolonách probíhaly za podobných tlaků, ale značný rozdíl byl v celkovém trvání jednotlivých analýz, které u náplňové kolony trvaly mnohonásobně déle. To potvrzují i hodnoty retenčních faktorů, které byly 3× vyšší pro náplňovou kolonu.

Asymetrie píků $T_{10\%}$ u náplňové kolony byla nižší než u monolitické kolony. Lze říci, že náplňová kolona poskytovala téměř symetrické (gausovské) píky.

Limit detekce a limit stanovitelnosti byly u monolitické kolony přibližně 7× nižší, než u náplňové kolony, což je velmi důležité při stanovování nízkých koncentrací analytů, například v biologickém materiálu.

Monolitická kolona vykazovala vyšší selektivitu, poskytovala dostatečné rozlišení analytů při mnohonásobně kratší době analýzy a měla výrazně nižší LOD a LOQ. Zároveň je vzhledem k vyšší permeabilitě výrazně méně náchylná k mechanickému zablokování než náplňová kolona, což je významné při analýzách biologického materiálu.

Uvedená kritéria byla rozhodující při volbě monolitické kolony (v kombinaci s předkolonou Chromolith 10×4,6 mm; C18) pro stanovení diastereoisomerů silybinu v plazmě.

4.2 HPLC metoda stanovení diastereoisomerů silybinu

V této práci bylo na základě informací z literatury ke stanovení diastereoisomerů silybinu využito mobilní fáze o složení $\text{CH}_3\text{CN}/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}/\text{HCOOH}$ (2/37/61/0,1; v/v/v/v) [Marhol 2011]. Z testovaných kolon byla zvolena z výše diskutovaných důvodů monolitická kolona C18 Chromolith Performance.

Ke kvantifikaci jednotlivých diastereoisomerů silybinu bylo využito metody vnitřního standardu. Jako IS byl ke vzorkům přidáván silybin A (při stanovení silybinu B) nebo silybin B (při stanovení silybinu A). Protože silybin absorbuje záření v UV oblasti spektra, bylo využito detekce při vlnové délce 285 nm. Průtok mobilní fáze byl zvolen $1,2 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, kdy bylo rozlišení jednotlivých analytů dostatečné ($R \geq 1,8$) a doba analýzy co nejkratší. Všechna stanovení byla prováděna při teplotě $25 \text{ }^\circ\text{C}$ a nástřík vzorku byl $50 \text{ }\mu\text{l}$.

4.2.1 Výtěžnost silybinu po úpravě vzorku - účinnost extrakce

Byly připraveny vodné roztoky silybinu A a silybinu B o hmotnostních koncentracích 0,1; 0,5; 1,0 a $1,5 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Z těchto roztoků bylo vždy v tripletu pipetováno $700 \text{ }\mu\text{l}$, extrahováno acetonem a upraveno postupem pro zjištění volného silybinu (kap. 3.4.3) s tím rozdílem, že k roztokům nebyl přidán žádný vnitřní standard. Vzorky byly následně analyzovány pomocí HPLC při použití mobilní fáze o složení $\text{CH}_3\text{CN}/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}/\text{HCOOH}$ (2/37/61/0,1; v/v/v/v) a průtoku $1,2 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Plocha píků jednotlivých silybinů byla porovnána s plochami píků, které poskytly výchozí roztoky. Účinnost extrakce silybinu A z vody byla $49 \pm 15 \text{ } \%$ a silybinu B $41 \pm 6 \text{ } \%$.

Hoh a kol. extrahovali silybin z plazmy ledovým methanolem a účinnost extrakce se pohybovala v rozmezí 53-58 % [Hoh 2007]. Rickling a kol. použili jako extrakční činidlo diethylether s účinností okolo 60 % [Rickling 1995]. Výtěžnost (recovery) silybinu byla významně zvýšena použitím extrakce pevnou fází (SPE). Účinnost extrakce sorbentem C18 byla okolo 85 %, avšak celý proces úpravy vzorku byl materiálově a časově náročný [Kosina 2000].

Pokud bylo k malému objemu (desítky μl) plazmy přidáno rozpouštědlo (s obsahem vnitřního standardu), které způsobilo denaturaci proteinů a následně byl supernatant analyzován pomocí HPLC, došlo významně ke zkrácení času potřebného pro úpravu vzorku a současně také ke zvýšení výtěžnosti silybinu až na $96 \pm 4 \text{ } \%$ [Wu 2007], či okolo 95 % [Li 2008].

4.3 Stanovení diastereoisomerů silybinu v plazmě potkanů

Vzorky plazmy byly upraveny postupy uvedenými v kapitolách 3.4.3 a 3.4.4. Dále byly analyzovány chromatografickou metodou pro stanovení silybinu (kap. 4.2).

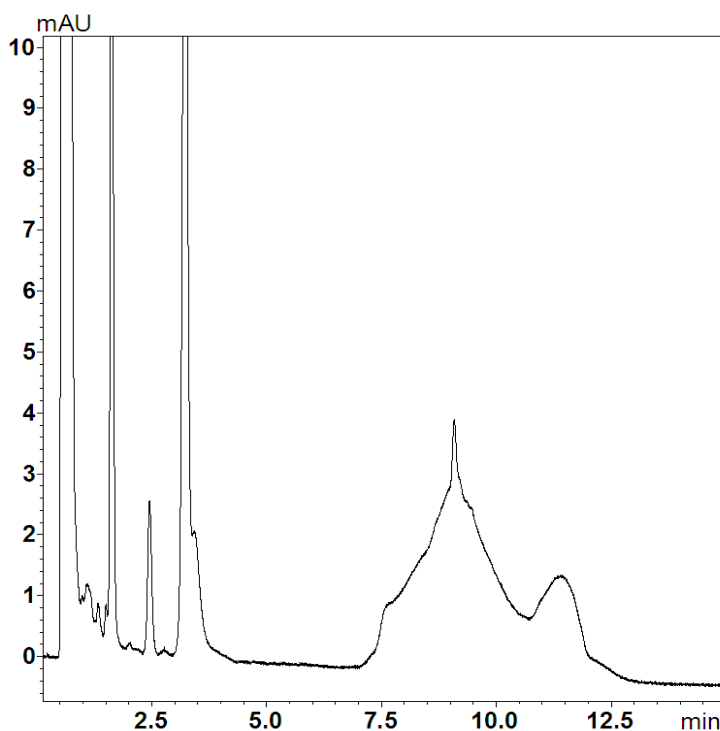
Při stanovení v plazmě laboratorních zvířat byly diastereoisomery silybinu v prvních šesti minutách analýzy isokraticky eluovány mobilní fází o složení CH₃CN/CH₃OH/H₂O/HCOOH (2/37/61/0,1; v/v/v/v). Průměrný retenční čas silybinu A byl 4,3 min; silybinu B 5,1 min. Směrodatná odchylka pro retenci silybinu A i silybinu B byla 0,1 min.

Gradientová eluce (Tab. 4) zajišťovala na konci analýzy vymytí látek s vysokou retencí a poté ekvilibraci kolony do původního stavu.

Tab. 4 – Program gradientu mobilní fáze pro stanovení diastereoisomerů silybinu z plazmy.

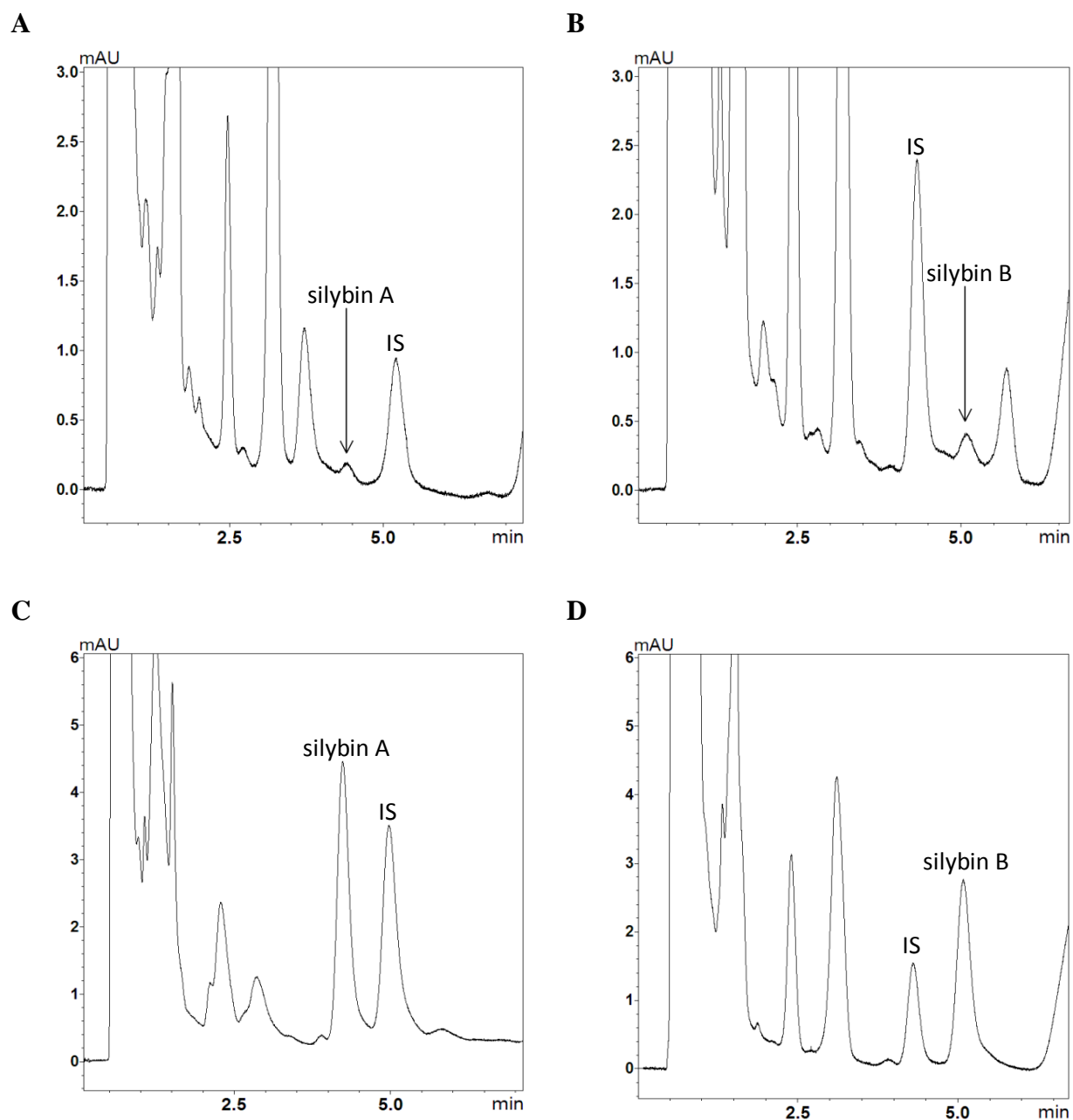
složení mobilní fáze			
A: CH ₃ CN/CH ₃ OH/H ₂ O/HCOOH (2/37/61/0,1; v/v/v/v)			
t, min	B: CH ₃ CN		
0-6	100 % A	0 % B	eluce diastereoisomerů silybinu
6-8	100-80 % A	0-20 % B	
8-10	80 % A	20 % B	eluce látek s vysokou retencí
10-11	80-100 % A	20-0 % B	
11-15	100 % A	0 % B	ekvilibrace kolony

Celkový chromatogram vzorku plazmy (zpracované dle kap. 3.4.3) od potkana, kterému nebyl aplikován silybin (analýza slepého vzorku) je uveden na obrázku 15. Na chromatogramu nejsou žádné signály, které by rušily stanovení diastereoisomerů silybinu (v retenčním čase cca 4 - 6 min). Signály v čase 0 až 3,5 minuty odpovídají eluci polárních látek; signál v rozmezí 7,5 až 12,5 minut odpovídá vymývání (mobilní fází s vyšším obsahem acetonitrilu) nepolárních látek s vysokou retencí z kolony.



Obr. 15 – Chromatogram analýzy slepého vzorku plazmy. Monolitická kolona Chromolith Performance C18 (100×3 mm), mobilní fáze $\text{CH}_3\text{CN}/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}/\text{HCOOH}$ (2/37/61/0,1; v/v/v/v), průtok $1,2 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ ($v = 3,42 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$). Nástrík $50 \mu\text{l}$, detekce $\lambda = 285 \text{ nm}$.

Pro každý časový bod (0,5 h; 1 h; 1,5 h; 2 h; 3 h; 4 h a 6 h) byla k dispozici 3 zvířata (dávkován silybin A) a 2 zvířata (dávkován silybin B). Pro všechny časové body a všechna zvířata byla analýza volného i celkového silybinu v plazmě provedena dvakrát – silybin A ($n = 6$ pro každý časový bod), silybin B ($n = 4$ pro každý časový bod). Typické chromatogramy stanovení volného a celkového silybinu A a B v plazmě jsou uvedeny na obrázku 16.



Obr. 16 – Chromatogramy stanovení diastereoisomerů silybinu v plazmě. Monolitická kolona Chromolith Performance C18 (100×3 mm), mobilní fáze $\text{CH}_3\text{CN}/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}/\text{HCOOH}$ (2/37/61/0,1; v/v/v/v), průtok $1,2 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ ($v = 3,42 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$). Nástřik $50 \mu\text{l}$, detekce $\lambda = 285 \text{ nm}$. IS byl silybin A (při stanovení silybinu B) nebo silybin B (při stanovení silybinu A).

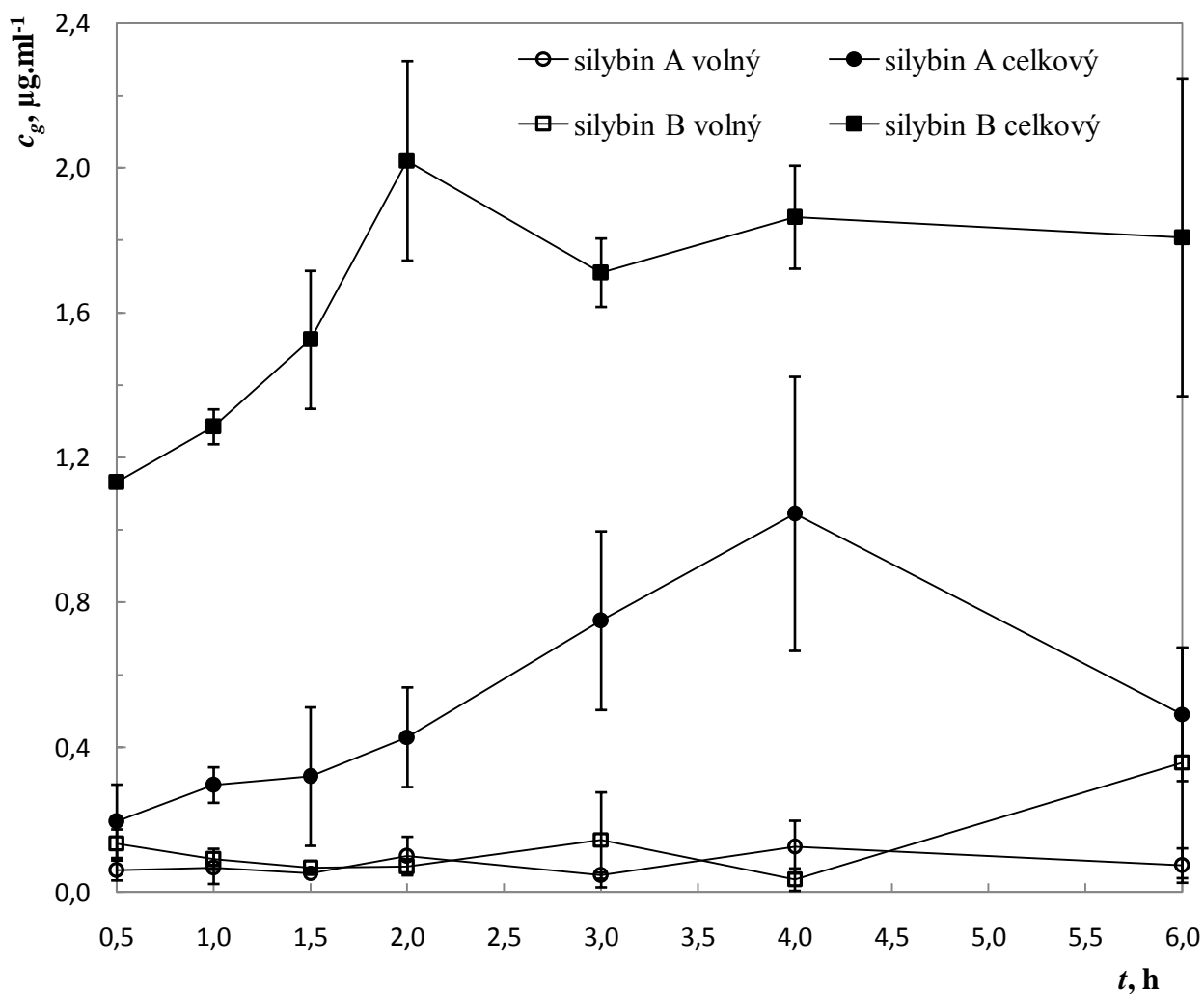
A – Stanovení volného silybinu A po 1 hodině od podání dávky.

B – Stanovení volného silybinu B po 2 hodinách od podání dávky.

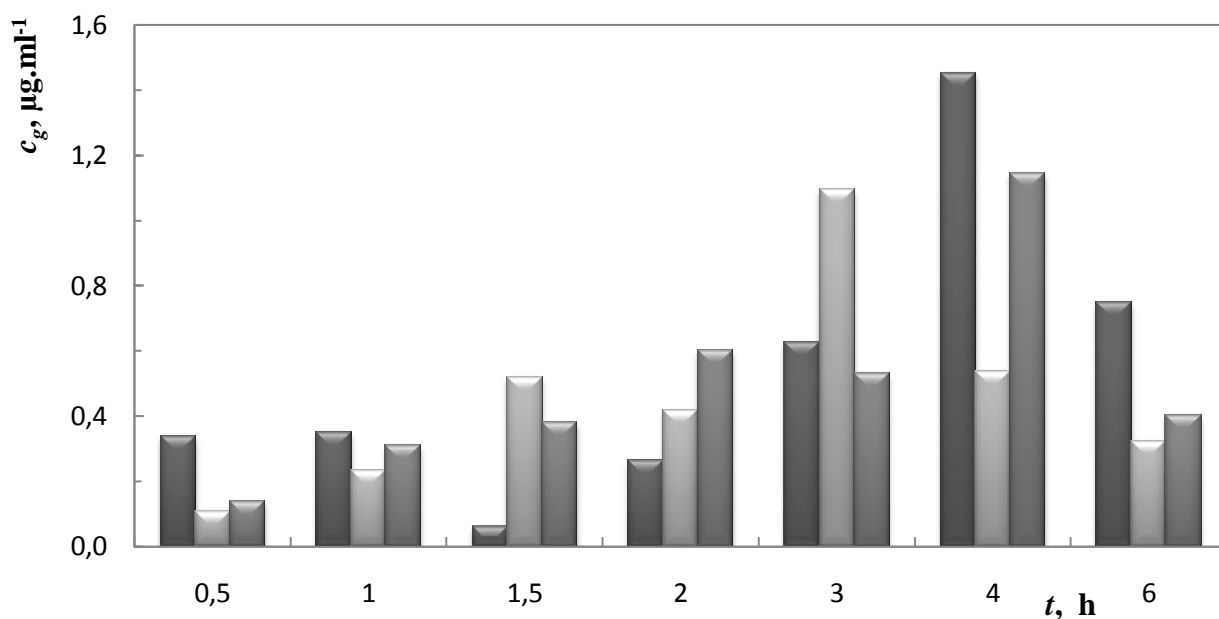
C – Stanovení celkového silybinu A po 3 hodinách od podání dávky.

D – Stanovení celkového silybinu B po 1 hodině od podání dávky.

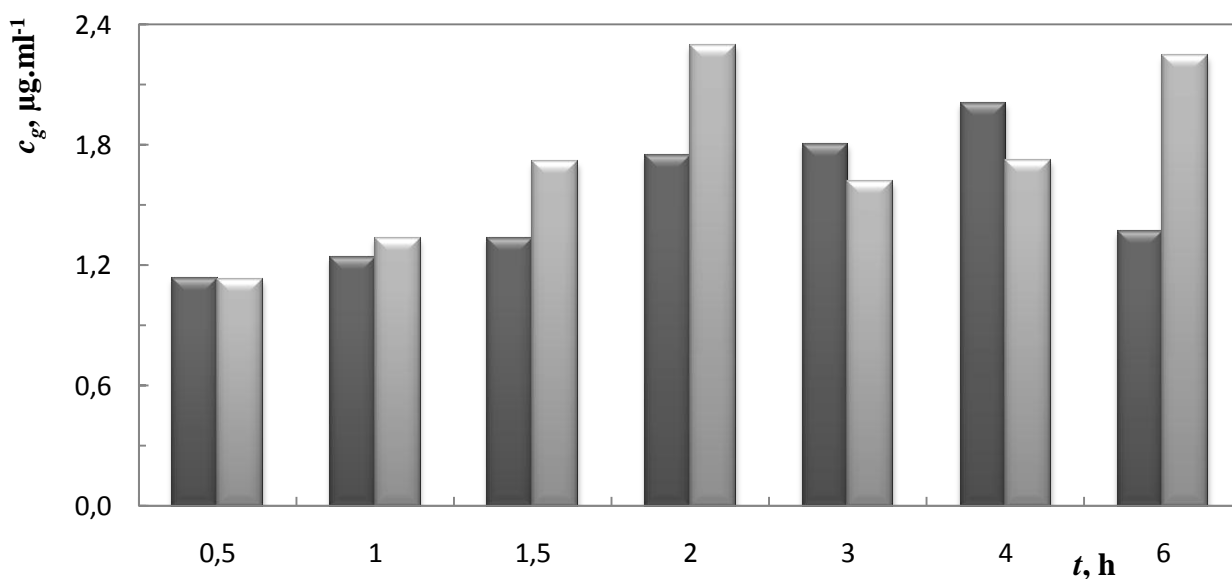
Nalezené koncentrace jednotlivých diastereoisomerů silybinu ve vzorcích plazmy jsou uvedeny v obrázku 17 jako průměrné hodnoty ze šesti měření pro každý časový bod (silybin A) a čtyř měření (silybin B). Délka chybových úseček (směrodatná odchylka hmotnostních koncentrací silybinu od různých potkanů pro daný časový bod) značí, jak výrazně se lišil metabolismus silybinu u jednotlivých potkanů (Obr. 18 a 19).



Obr. 17 – Hmotnostní koncentrace volného a celkového silybinu A a B v plazmě potkanů v jednotlivých časových bodech od podání dávky silybinu (intragastricky cca 200 mg.kg⁻¹). Body jsou zobrazeny jako průměrné hodnoty. Chybové úsečky značí směrodatnou odchylku souboru hmotnostních koncentrací silybinu A (n = 6) a silybinu B (n = 4) u jednotlivých potkanů. Monolitická kolona Chromolith Performance C18 (100×3 mm), mobilní fáze CH₃CN/CH₃OH/H₂O/HCOOH (2/37/61/0,1; v/v/v/v), průtok 1,2 ml.min⁻¹ (v = 3,42 mm.s⁻¹), nástřik 50 µl, detekce λ = 285 nm.



Obr. 18 – Průměrné hmotnostní koncentrace celkového silybinu A v plazmě pro jednotlivé potkany (2 měření od každého zvířete). Monolitická kolona Chromolith Performance C18 (100×3 mm), mobilní fáze CH₃CN/CH₃OH/H₂O/HCOOH (2/37/61/0,1; v/v/v/v), průtok 1,2 ml.min⁻¹ (v = 3,42 mm.s⁻¹), nástřik 50 µl, detekce λ = 285 nm.



Obr. 19 – Průměrné hmotnostní koncentrace celkového silybinu B v plazmě pro jednotlivé potkany (2 měření od každého zvířete). Monolitická kolona Chromolith Performance C18 (100×3 mm), mobilní fáze CH₃CN/CH₃OH/H₂O/HCOOH (2/37/61/0,1; v/v/v/v), průtok 1,2 ml.min⁻¹ (v = 3,42 mm.s⁻¹), nástřik 50 µl, detekce λ = 285 nm.

4.3.1 Farmakokinetický profil diastereoisomerů silybinu

Volný silybin A a B

V metabolismu silybinu má významnou roli stereoselektivita. Ve studii Weyhenmeyera a kol. [Weyhenmeyer 1992] bylo po perorálním podání silymarinových kapslí dobrovolníkům v průměru pouze 10 % z celkového množství silybinu v plazmě nekonjugováno. V naší studii bylo v průměru 13 % z celkového množství silybinu (A i B) v plazmě nekonjugováno.

Metabolismus se však pro diastereoisomery silybinu zcela zásadně lišil. Množství volného silybinu A bylo průměrně v celém časovém rozsahu 18 % z celkového množství silybinu A v plazmě, volného silybinu B bylo pouze 8 % z celkového množství silybinu B. K podobným výsledkům došli i Rickling a kol. [Rickling 1995], kteří zjistili, že v plazmě bylo nekonjugováno 23 % silybinu A a 3 % silybinu B.

Koncentrace volného silybinu A (v čase 1,5 a 3 hodiny) a volného silybinu B (v čase 1,5 a 4 hodiny) byly tak nízké, že byly nad limitem detekce, avšak pod limitem stanovitelnosti. Hmotnostní koncentrace volného silybinu B byla průměrně v celém časovém rozsahu 1,7× vyšší než volného silybinu A. K opačným výsledkům došli Wen a kol. [Wen 2008], kteří dávali silymarin – koncentrace volného silybinu A byla 1,5× vyšší než volného silybinu B; a také Li a kol. [Li 2008], kteří dávali komplex silybin-fosfatidyleholinu – koncentrace volného silybinu A byla přibližně 3× vyšší než volného silybinu B. Obě studie však byly prováděny na lidských dobrovolnících a se směsí obou diastereoisomerů silybinu.

Celkový silybin A a B

Hmotnostní koncentrace celkového silybinu B byly průměrně v celém časovém rozsahu 4,4× vyšší než silybinu A, což znamená, že silybin B se v organismu konjuguje rychleji a ve větším rozsahu než silybin A. To potvrzují i další studie [Weyhenmeyer 1992, Han 2004, Jančová 2011]. Podobných výsledků dosáhli i Rickling a kol. [Rickling 1995], kteří zjistili, že koncentrace volného i celkového silybinu B byla přibližně 4× vyšší než silybinu A. V další studii [Wen 2008] byla koncentrace celkového silybinu B 3× vyšší než celkového silybinu A.

Celkový farmakokinetický profil silybinu A a B

Tato studie je unikátní, protože se v ní poprvé pracuje se separovanými diastereoisomery silybinu. Dosud se v literatuře objevují výsledky farmakokinetických studií využívajících pouze směsný silybin nebo dokonce silymarin.

Dávkování jednotlivých diastereoisomerů silybinu odděleně má však zásadní vliv na farmakokinetický profil diastereoisomerů silybinu. Tato skutečnost je patrná z posunu maximálních koncentrací - pro celkový silybin A v čase 4 hodin (1,05 µg/ml) a celkový silybin B v čase 2 hodin (2,02 µg/ml).

Ve studiích, ve kterých byl dávkován směsný silybin (silymarin [Rickling 1995, Wen 2008], různé kapsle [Kim 2003b] či komplex silybin-fosfatidylcholinu [Li 2008]) lidským dobrovolníkům, se maximální zjištěné koncentrace celkových diastereoisomerů silybinu pohybovaly v intervalu 1 – 2 hodin. Po orální dávce směsného silybinu potkanům byly maximální zjištěné koncentrace celkových diastereoisomerů silybinu již v čase půl hodiny od podání dávky [Wu 2007].

5 Závěr

Diplomová práce se zabývá vypracováním analytické metody pro HPLC stanovení diastereoisomerů silybinu (volných a celkových) v plazmě laboratorních zvířat. Nejprve byly na základě chromatografických parametrů porovnány dvě analytické kolony – náplňová Gemini C18; 5 μm ; 150 \times 4,6 mm a monolitická Chromolith Performance C18; 100 \times 3 mm.

Pro stanovení diastereoisomerů silybinu byla zvolena monolitická kolona, protože vykazovala vyšší selektivitu a poskytovala dostatečné rozlišení analytů při mnohonásobně kratší době analýzy. Také limity detekce a stanovitelnosti dosažené při použití monolitické kolony byly výrazně nižší.

Kvantifikace diastereoisomerů silybinu v biologických vzorcích byla provedena metodou vnitřního standardu, a to silybinu A při stanovení silybinu B nebo silybinu B při stanovení silybinu A. Proteiny obsažené v plazmě byly před analýzou denaturovány ledovým acetonem, přičemž zároveň docházelo k extrakci diastereoisomerů silybinu z plazmy. Účinnost extrakce silybinu A z vody byla $49 \pm 15 \%$ a silybinu B $41 \pm 6 \%$.

Na základě literární rešerše a předešlých zkušeností bylo ke stanovení silybinu využito mobilní fáze o složení $\text{CH}_3\text{CN}/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}/\text{HCOOH}$ (2/37/61/0,1; $v/v/v/v$) a detekce při vlnové délce 285 nm. Průtok mobilní fáze byl $1,2 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, kdy bylo rozlišení jednotlivých analytů dostatečné ($R \geq 1,8$) a celková doba analýzy byla 15 minut včetně ekvilibrace kolony před dalším měřením.

Nejprve byly ve vzorcích plazmy stanoveny volné diastereoisomery silybinu. Poté byly ke vzorkům přidány enzymy β -glukuronidasa a sulfatasa, které hydrolyzovaly konjugáty silybinu (glukuronidy a sulfáty silybinu). Následně bylo stanoveno celkové množství jednotlivých diastereoisomerů silybinu v plazmě.

V této práci bylo poprvé využito opticky čistých diastereoisomerů silybinu – dosud se v literatuře objevují výsledky farmakokinetických studií využívajících pouze směsný silybin nebo dokonce silymarin.

Studie prokázala, že stereoselektivita má v metabolismu silybinu zcela zásadní roli. Hmotnostní koncentrace celkového silybinu B byly průměrně v celém časovém rozsahu 4,4 \times vyšší než silybinu A, což znamená, že silybin B se v organismu konjugoval rychleji a ve větší míře než silybin A. Metabolismus diastereoisomerů silybinu se významně lišil. Množství volného silybinu A bylo průměrně v celém časovém rozsahu 18 % z celkového

množství silybinu A v plazmě, zatímco volného silybinu B bylo pouze 8 % z celkového množství silybinu B v plazmě.

Intragastrické dávkování opticky čistých diastereoisomerů silybinu potkanům odděleně má zcela zásadní vliv na farmakokinetický profil diastereoisomerů silybinu. Nejlépe je to patrné z posunu maxima hmotnostních koncentrací - pro celkový silybin A v čase 4 hodin a pro celkový silybin B v čase 2 hodin. V jiné studii byly po orální dávce směsného silybinu potkanům maximální koncentrace celkových diastereoisomerů silybinu již po půl hodině od podání dávky. Po podání směsného silybinu nebo silymarinu lidským dobrovolníkům se maximální koncentrace celkových diastereoisomerů silybinu pohybovaly v intervalu 1 – 2 hodin.

Z této studie vyplývá, že metabolismus silybinu A a silybinu B se vzájemně výrazně ovlivňuje. Proto je nutno všechny předchozí studie provedené se směsným silybinem nebo silymarinem podrobit kritické analýze s ohledem na výsledky získané s využitím opticky čistých diastereoisomerů silybinu.

Seznam citované literatury

Abia J. A., Mriziq K. S., Guiochon G. A.: Radial heterogeneity of some analytical columns used in high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1216 (2009), 3185-3191.

Afaq F., Adhami V. M., Ahmad N., Mukhtar H.: Botanical antioxidants for chemoprevention of photocarcinogenesis. *Frontiers in Bioscience* 7 (2002), 784-792.

Baer-Dubowska W., Szaefer H., Krajka-Kuzniak V.: Inhibition of murine hepatic cytochrome P450 activities by natural and synthetic phenolic compounds. *Xenobiotica* 28 (1998), 735-743.

Barzaghi N., Crema F., Gatti G., Pifferi G., Perucca E.: Pharmacokinetic studies on IdB 1016, a silybin-phosphatidylcholine complex, in healthy human subjects. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 15 (1990), 333-338.

Beedham C.: The role of non-P450 enzymes in drug oxidation. *Pharmacy World & Science* 19 (1997), 255-263.

Carini R., Comoglio A., Albano E., Poli G.: Lipid peroxidation and irreversible damage in the rat hepatocyte model. Protection by the silybin-phospholipid complex IdB 1016. *Biochemical Pharmacology* 43 (1992), 2111-2115.

Collier A. C., Ganley N. A., Tingle M. D., Blumenstein M., Marvin K. W., Paxton J. W., Mitchell M. D., Keelan J. A.: UDP-glucuronosyltransferase activity, expression and cellular localization in human placenta at term. *Biochemical Pharmacology* 63 (2002), 409-419.

D'Andrea V., Perez L. M., Sanchez Pozzi E. J.: Inhibition of rat liver UDP-glucuronosyltransferase by silymarin and the metabolite silibinin-glucuronide. *Life Sciences* 77 (2005), 683-692.

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.: Milk thistle and prostate cancer: differential effects of pure flavonolignans from *Silybum marianum* on antiproliferative end points in human prostate carcinoma cells. *Cancer Research* 65 (2005), 4448-4457.

Day A. J., Bao Y., Morgan M. R. A., Williamson G.: Conjugation position of quercetin glucuronides and effect on biological activity. *Free Radical Biology and Medicine* 29 (2000), 1234-1243.

Džubák P., Hajdúch M., Gažák R., Svobodová A., Psotová J., Walterová D., Sedmera P., Křen V.: New derivatives of silybin and 2,3-dehydrosilybin and their cytotoxic and P-glycoprotein modulatory activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 14 (2006), 3793-3810.

Favari L., Perez-Alvarez V.: Comparative effects of colchicine and silymarin on CCl₄-chronic liver damage in rats. *Archives of Medical Research* 28 (1997), 11-17.

Ferenci P., Dragosics B., Dittrich H., Frank H., Benda L., Lochs H., Meryn S., Base W., Schneider B.: Randomized controlled trial of silymarin treatment in patients with cirrhosis of the liver. *Journal of Hepatology* 9 (1989), 105-113.

Ferrari C. K. B., Torres E. A. F. S.: Biochemical pharmacology of functional foods and prevention of chronic diseases of aging. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 57 (2003), 251-260.

Fisher M. B., Paine M. F., Strelevitz T., Wrighton S. A.: The role of hepatic and extrahepatic UDP-glucuronosyltransferases in human drug metabolism. *Drug Metabolism Reviews* 33 (2001), 273-297.

Flora K., Hahn M., Rosen H., Benner K.: Milk thistle (*Silybum marianum*) for the therapy of liver disease. *The American Journal of Gastroenterology* 93 (1998), 139-143.

Gažák R., Walterová D., Křen V.: Silybin and silymarin – new and emerging applications in medicine. *Current Medicinal Chemistry* 14 (2007), 315-338.

Gažák R., Sedmera P., Vrbacký M., Vostálová J., Drahotka Z., Marhol P., Walterová D., Křen V.: Molecular mechanisms of silybin and 2,3-dehydrosilybin antiradical activity-role of individual hydroxyl groups. *Free Radical Biology and Medicine* 46 (2009), 745-758.

Gažák R., Marhol P., Purchartová K., Monti D., Biedermann D., Riva S., Cvak L., Křen V.: Large-scale separation of silybin diastereoisomers using lipases. *Process Biochemistry* 45 (2010), 1657-1663.

Gibby S. G., Younker J. M., Hengge A. C.: Investigation of the sulfuryl transfer step from substrate to enzyme by arylsulfatases. *Journal of Physical Organic Chemistry* 17 (2004), 541-547.

Graf T. N., Wani M. C., Agarwal R., Kroll D. J., Oberlies N. H.: Gram-scale purification of flavonolignan diastereoisomers from *Silybum marianum* (Milk Thistle) extract in support of preclinical *in vivo* studies for prostate cancer chemoprevention. *Planta Medica* 73 (2007), 1495-1501.

Grau J., Jung R., Munker B.: Bobulovitě, užitkové a léčivé rostliny, str. 196. Ikar, Praha 1996.

Hadad G. M., Emara S., Abdel-Salam R. A.: Validated optimized method for simultaneous analysis of active silymarin components and dimethyl-4,4'-dimethoxy-5,6,5',6'-dimethylene dioxybiphenyl-2,2'-dicarboxylate in a pharmaceutical preparation by use of a monolithic silica C18 column. *Chromatographia* 70 (2009), 217-221.

Hahn V. G., Lehmann H. D., Kurten M., Uebel H., Vogel G.: Pharmacology and toxicology of silymarin, the anti-hepatotoxic agent of *Silybum marianum*. *Arzneimittel-Forschung-Drug Research* 18 (1968), 698-704.

Han Y. H., Lou H. X., Ren D. M., Sun L. R., Ma B., Ji M.: Stereoselective metabolism of silybin diastereoisomers in the glucuronidation process. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 34 (2004), 1071-1078.

Hänsel R., Schulz J., Pelter A.: Structure of silybin: synthetic studies. *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications* 1 (1972), 195-196.

Hanson S. R., Best M. D., Wong Ch. H.: Sulfatases: structure, mechanism, biological activity, inhibition, and synthetic utility. *Angewandte Chemie International Edition* 43 (2004), 5736-5763.

Hoh C., Boocock D., Marczylo T., Singh R., Berry D. P., Dennison B. A., Hemingway D., Miller A., West K., Euden S., Garcea G., Farmer P. B., Steward W. P., Gescher A. J.: Pilot study of oral silibinin, a putative chemopreventive agent, in colorectal cancer patients: silibinin levels in plasma, colorectum, and liver and their pharmacodynamic consequences. *Clinical Cancer Research* 12 (2006) 2944-2950.

Hoh C. S. L., Boocock D. J., Marczylo T. H., Brown V. A., Cai H., Steward W. P., Berry D. P., Gescher A. J.: Quantitation of silibinin, a putative cancer chemopreventive agent derived from milk thistle (*Silybum marianum*), in human plasma by high-performance liquid chromatography and identification of possible metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (2007), 2532-2535.

Horvath C. G., Preiss B. A., Lipsky S. R.: Fast liquid chromatography: An investigation of operating parameters and the separation of nucleotides on pellicular ion exchangers. *Analytical Chemistry* 39 (1967), 1422-1428.

Hruby K., Csomos G., Fuhrmann M., Thaler H.: Chemotherapy of *Amanita phalloides* poisoning with intravenous silibinin. *Human Toxicology* 2 (1983), 183-195.

Hu M.: Commentary: bioavailability of flavonoids and polyphenols: call to arms. *Molecular Pharmaceutics* 4 (2007), 803-806.

Chapman E., Best M. D., Hanson S. R., Wong Ch-H.: Sulfotransferases: structure, mechanism, biological activity, inhibition, and synthetic utility. *Angewandte Chemie-International Edition in English* 43 (2004), 3526-3548.

Churáček J., Jandera P.: Úvod do vysokoúčinné kapalinové chromatografie. SNTL, Praha 1984.

Jacobs B. P., Dennehy C., Ramirez G., Sapp J., Lawrence V. A.: Milk thistle for the treatment of liver disease: A systematic review and meta-analysis. *American Journal of Medicine* 113 (2002), 506-515.

Jahodář L.: Farmakobotanika, semenné rostliny. Karolinum, Praha 2006.

Jančová P., Šiller M., Anzenbacherová E., Křen V., Anzenbacher P., Šimánek V.: Evidence for differences in regioselective and stereoselective glucuronidation of silybin diastereomers from milk thistle (*Silybum marianum*) by human UDP-glucuronosyltransferases. *Xenobiotica* 41 (2011), 743-751.

Janiak B., Hänsel R.: Phytochemisch-pharmakognostische untersuchungen über *fructus cardui mariae*. *Planta Medica* 8 (1960), 71-83.

Jegorov A.: Flavanolignany – novověká chemie léčivé rostliny známé již před Kristem. *Chemické Listy* 90 (1996), 859-862.

Jia L., Zhang D., Li Z., Duan C., Wang Y., Feng F., Wang F., Liu Y., Zhang Q.: Nanostructured lipid carriers for parenteral delivery of silybin: Biodistribution and pharmacokinetic studies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 80 (2010), 213-218.

Johnson V. J., He Q., Osuchowski M. F., Sharma R. P.: Physiological responses of a natural antioxidant flavonoid mixture, silymarin, in BALB/c mice: III. Silymarin inhibits T-lymphocyte function at lowdoses but stimulates inflammatory processes at high doses. *Planta Medica* 69 (2003), 44-49.

Karpálek F., Stárka J., Závada V.: Úvod do enzymologie. Nakladatelství československé akademie věd, Praha 1961.

Katiyar S. K.: Silymarin and skin cancer prevention: anti-inflammatory, antioxidant and immunomodulatory effects (Review). *International Journal of Oncology* 26 (2005), 169-176.

Kauffman F. C.: Sulfonation in pharmacology and toxicology. *Drug Metabolism Reviews* 36 (2004), 823-843.

- Kim N. Ch., Graf T. N., Sparacino Ch. M., Wani M. C., Wall M. E.: Complete isolation and characterization of silybins and isosilybins from milk thistle (*Silybum marianum*). *Organic & Biomolecular Chemistry* 1 (2003a), 1684-1689.
- Kim Y. C., Kim E. J., Lee E. D., Kim J. H., Jang S. W., Kim Y. G., Kwon J. W., Kim W. B., Lee M. G.: Comparative bioavailability of silibinin in healthy male volunteers. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics* 41 (2003b), 593-596.
- King C. D., Rios G. R., Assouline J. A., Tephly T. R.: Expression of UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) 2B7 and 1A6 in the human brain and identification of 5-hydroxytryptamine as a substrate. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 365 (1999), 156-62.
- Knejzlík Z., Káš J., Ruml T.: Mechanismus vstupu xenobiotik do organismu a jejich detoxikace. *Chemické listy* 94 (2000), 913-918.
- Kobayashi H., Ikegami T., Kimura H., Hara T., Tokuda D., Tanaka N.: Properties of monolithic silica columns for HPLC. *Analytical Sciences* 22 (2006), 491-501.
- Kohno H., Tanaka T., Kawabata K., Hirose I., Sugie S., Tsuda H., Mori H.: Silymarin, a naturally occurring polyphenolic antioxidant flavonoid, inhibits azoxymethane-induced colon carcinogenesis in male F344 rats. *International Journal of Cancer* 101(2002), 461-468.
- Koch H., Zinsberger G.: Physikochemische eigenschaften von silymarin, 2. mitt. löslichkeitsparameter von silybin, silydianin und silychristin. *Archiv der Pharmazie* 313 (1980), 526-533.
- Kolářová P.: Preparativní diastereomerní dělení silybinu a jeho sulfátů pomocí RP-HPLC. Bakalářská práce. Praha 2010.
- Korbelář E.: Naše rostliny v lékařství, str. 306. Avicentrum, Praha 1981.
- Kosina P., Bartek J.: Stanovení silybinu v krevní plasmě vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s extrakcí na pevné fázi. *Chemické Listy* 94 (2000), 1115-1117.
- Krejčí M., Pajurek J., Komers R.: Výpočty a veličiny v sorpční kolonové chromatografii. SNTL, Praha 1990.
- Křen V., Gažák R., Purchartová K., Marhol P., Biedermann D., Sedmera P.: Chemoenzymatic preparative separation of silybins A and B. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 61 (2009), 247-251.

Křen V., Ulrichová J., Kosina P., Stevenson D., Sedmera P., Příkrylová V., Halada P., Šimánek V.: Chemoenzymatic preparation of silybin β -glucuronides and their biological evaluation. *Drug Metabolism and Disposition* 28 (2000), 1513-1517.

Lee J. I., Hsu B. H., Wu D., Barrett J. S.: Separation and characterization of silybin, isosilybin, silydianin and silychristin in milk thistle extract by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1116 (2006), 57-68.

Letteron P., Labbe G., Degott C., Berson A., Fromenty B., Delaforge M., Larrey D., Pessayre D.: Mechanism for the protective effects of silymarin against carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation and hepatotoxicity in mice. Evidence that silymarin acts both as an inhibitor of metabolic activation and as a chain-breaking antioxidant. *Biochemical Pharmacology* 39 (1990), 2027-2034.

Li W., Gao J., Zhao H. Z., Liu C. X.: Development of a HPLC-UV assay for silybin-phosphatidylcholine complex (silybinin capsules) and its pharmacokinetic study in healthy male Chinese volunteers. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 31 (2006), 265-270.

Li W., Han J., Li Z., Li X., Zhou S., Liu Ch.: Preparative chromatographic purification of diastereomers of silybin and their quantification in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 862 (2008), 51-57.

Lin C. W., Orcutt M. L., Fishman W. H.: Purification and characterization of mouse kidney β -glucuronidase. *Journal of Biological Chemistry* 250 (1975), 4737-4743.

Liu Z., Hu M.: Natural polyphenol disposition via coupled metabolic pathways. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 3 (2007), 389-406.

Lorenz D., Lucker P. W., Mennicke W. H., Wetzelsberger N.: Pharmacokinetic studies with silymarin in human serum and bile. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology* 6 (1984), 655-661.

Mansour H. H., Hafez H. F., Fahmy N. M.: Silymarin modulates cisplatin induced oxidative stress and hepatotoxicity in rats. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 39 (2006), 656-661.

Marhol P., Gažák R., Bednář P., Křen V.: Narrow-bore core-shell particles and monolithic columns in the analysis of silybin diastereoisomers. *Journal of Separation Science* 34 (2011), 2206-2213.

- Mascher H., Kikuta C., Weyhenmeyer R.: Diastereomeric separation of free and conjugated silibinin in plasma by reversed phase HPLC after specific extraction. *Journal of Liquid Chromatography* 16 (1993), 2777-2789.
- Meinl W., Meerman J. H., Glatt H.: Differential activation of promutagens by alloenzymes of human sulfotransferase 1A2 expressed in *Salmonella typhimurium*. *Pharmacogenetics* 12 (2002), 677-689.
- Middleton E., Kandaswami Ch., Theoharides T.: The effects of plant flavonoids on mammalian cells - implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacological Reviews* 52 (2000), 673-751.
- Minakuchi H., Nakanishi K., Soga N., Ishizuka N., Tanaka N.: Effect of skeleton size on the performance of octadecylsilylated continuous porous silica columns in reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 762 (1997), 135-146.
- Mireille Ch., Bayol-Denizot C., Suleman G., Roux F., Minn A.: Drug metabolizing enzyme activities and superoxide formation in primary and immortalized rat brain endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry* 62 (1998), 151-163.
- Modrianský M., Valentová K., Příkrylová V., Walterová D.: Přírodní látky v prevenci onemocnění trávicího traktu. *Chemické Listy* 97 (2003), 540-547.
- Morazzoni P., Montalbetti A., Malandrino S., Pifferi G.: Comparative pharmacokinetics of silipide and silymarin in rats. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 18 (1993), 289-297.
- Morazzoni P., Bombardelli E.: *Silybum marianum* (*Carduus marianus*). *Fitoterapia* 66 (1995), 3-42.
- Mourelle M., Favari L., Amezcua J. L.: Protection against thallium hepatotoxicity by silymarin. *Journal of Applied Toxicology* 8 (1988), 351-354.
- Muriel P., Garciapina T., Perez-Alvarez V., Mourelle M.: Silymarin protects against paracetamol-induced lipid peroxidation and liver damage. *Journal of Applied Toxicology* 12 (1992), 439-442.
- Nakamura T., Tanaka R., Ashida H.: Possible evidence of contamination by catechins in deconjugation enzymes from *Helix pomatia* and *Abalone entrails*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 75 (2011), 1506-1510.

- Paigen K.: Mammalian β -glucuronidase: genetics, molecular biology, and cell biology. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 37 (1989), 155-205.
- Parkinson A.: Biotransformation of xenobiotics, in Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, McGraw-Hill, New York, 2001.
- Pelter A., Hänsel R.: The structure of silybin (silybum substance E₆), the first flavonolignan. *Tetrahedron Letters* 25 (1968), 2911-2916.
- Pelter A., Hänsel R.: Struktur des Silybins: I. Abbauversuche. *Chemische Berichte* 108 (1975), 790-802.
- Pietrangelo A., Borella F., Casalgrandi G.: Antioxidant activity of silybin *in vivo* during long-term iron overload in rats. *Gastroenterology* 109 (1995), 1941-1949.
- Plíšková M., Vondráček M., Křen V., Gažák R., Sedmera P., Walterová D., Psotová J., Šimánek V., Machala M.: Effects of silymarin flavonolignans and synthetic silybin derivatives on estrogen and aryl hydrocarbon receptor activation. *Toxicology* 215 (2005), 80-89.
- Rainone F.: Milk Thistle. *American Family Physician* 72 (2005), 1285-1288.
- Rickling B., Hans B., Kramarczyk R., Krumbiegel G., Weyhenmeyer R.: Two high-performance liquid chromatographic assays for the determination of free and total silibinin diastereomers in plasma using column switching with electrochemical detection and reversed-phase chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Chromatography B* 670 (1995), 267-277.
- Singh R. P., Agarwal R.: Prostate cancer chemoprevention by silibinin: Bench to bedside. *Molecular Carcinogenesis* 45 (2006), 436-442.
- Schrall R., Becker H.: Callus-und suspensionskulturen von *Silybum marianum*. *Planta Medica* 32 (1977), 27-32.
- Slavík B., Štěpánková J., Štěpánek J., Křísa B.: Květena české republiky 7, str. 422. Academia, Praha 2004.
- Sutherland L., Ebner T., Burchell B.: The expression of UDP-glucuronosyltransferases of the UGT1 family in human liver and kidney and in response to drugs. *Biochemical Pharmacology* 45 (1993), 295-301.
- Straub F. B.: Biochemie. Nakladatelství Československé akademie, Praha 1962.

Swank R. T., Pfister K., Miller D., Chapman V.: The egasyn gene affects the processing of oligosaccharides of lysosomal beta-glucuronidase in liver. *Biochemical Journal* 240 (1986), 445-454.

Štulík K. et al.: Analytické separační metody. Karolinum, Praha 2004.

Tukey R. H., Strassburg C. P.: Human UDP-glucuronosyltransferases: metabolism, expression, and disease. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 40 (2000), 581-616.

Valenzuela A., Lagos C., Schmidt K., Videla L. A.: Silymarin protection against hepatic lipid peroxidation induced by acute ethanol intoxication in the rat. *Biochemical Pharmacology* 34 (1985), 2209-2212.

Váňa P.: Rady bylináře Pavla, str. 29. ÁKA Čejkovo nakladatelství, Praha 1990.

Vodrážka Z.: Biochemie 1. Academia, nakladatelství Československé akademie věd, Praha 1992.

Vodrážka Z.: Biochemie 3. Academia, nakladatelství Akademie věd České republiky, Praha 1993.

Vogel G., Tuchweber B., Trost W., Mengs U.: Protection by silibinin against *Amanita phalloides* intoxication in beagles. *Toxicology and Applied Pharmacology* 73 (1984), 355-362.

Volf K., Andrs F.: Flavonoidy a jejich biologické působení. JuWital s.r.o., Praha 2008.

Wen Z., Dumas T. E., Schrieber S. J., Hawke R. L., Fried M. W., Smith P. C.: Pharmacokinetics and metabolic profile of free, conjugated, and total silymarin flavonolignans in human plasma after oral administration of milk thistle extract. *Drug Metabolism and Disposition* 36 (2008), 65-72.

Weyhenmeyer R., Mascher H., Birkmayer J.: Study on dose-linearity of the pharmacokinetics of silibinin diastereomers using a new stereospecific assay. *International Journal of Clinical Pharmacology, Therapy, and Toxicology* 30, (1992), 134-138.

Wiener S. L., Wiener R., Janov C., Darmstadt R., Upmanis S., Urivetzky M., Meilman E.: Kinetic study of neutrophil and inflammatory fluid beta glucuronidase. *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology* 10 (1975), 491-499.

Wu J. W., Lin L. Ch., Hung S. Ch., Chi Ch. W., Tsai T. H.: Analysis of silibinin in rat plasma and bile for hepatobiliary excretion and oral bioavailability application. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 45 (2007), 635-641.

www.hplc.cz/Tip/asymm_factor.htm Obrázek stažen dne 15. 3. 2012 a upraven programem Adobe Photoshop CS3.

Zhang L., Zuo Z., Lin G.: Intestinal and hepatic glucuronidation of flavonoids. *Molecular Pharmaceutics* 4 (2007), 833-845.

Zhao J., Agarwal R.: Tissue distribution of silibinin, the major active constituent of silymarin, in mice and its association with enhancement of phase II enzymes: implications in cancer chemoprevention. *Carcinogenesis* 20 (1999), 2101-2108.

Zhao J., Lahiri-Chatterjee M., Sharma Y., Agarwal R.: Inhibitory effect of a flavonoid antioxidant silymarin on benzoyl peroxide-induced tumor promotion, oxidative stress and inflammatory responses in SENCAR mouse skin. *Carcinogenesis* 21 (2000), 811-816.