Analiza leków i suplementów diety z wyciągiem z owoców ostropestu plamistego z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej

Agata Walkowiak¹, Bogumiła Kupcewicz¹, Kacper Wnuk¹, Mariusz Zapadka¹

¹ Katedra i Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy

Adres do korespondencji: Agata Walkowiak, Katedra i Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy, ul. dr. A. Jurasza 2, 85-089 Bydgoszcz, e-mail: agatawalkowiak1991@gmail.com

Wstęp

Silybum marianum (L.) Geartner jest jednym z ważniejszych, farmakopealnych surowców roślinnych, znanym od wieków jako korzystnie wpływający na funkcjonowanie wątroby. Ze względu na brak wygórowanych wymagań co do uprawy występuje w wielu szerokościach geograficznych na świecie m.in. Afryce Północnej, Azji Mniejszej, na Kaukazie oraz w południowej Europie, a także w Polsce – jako roślina uprawna lub dziko rosnąca [1]. Do celów leczniczych wykorzystywane są owoce ostropestu plamistego (łac. *Sylbi mariani fructus*) pozyskiwane z dojrzałych koszyczków zbieranych pod koniec sierpnia lub we wrześniu. Wyciąg ze zmieszanych owoców, które rozwijają się z purpurowych kwiatów ostropestu plamistego, zawiera 65–80% sylimaryny oraz 20–35% niescharakteryzowanych polifenoli i kwasów tłuszczowych, jak linolowy, oleinowy i palmitynowy [2]. Jednak to sylimaryna uważana jest za główną i najważniejszą frakcję wyciągu. Stanowi ona kompleks flawonolignanów (sylibiny A, sylibiny B, izosylibiny A, izosylibiny B, sylchristyny, izosylchristyny i sylidianiny) oraz aktywnych flawonoidów (taksyfoliny). Cztery pierwsze wymienione związki należą do grupy diastereoizomerycznych flawonolignanów. [3, 4] Oczywiście jest, że w terapii powinny znaleźć zastosowanie standaryzowane ekstrakty. Zgodnie z Farmakopeą Europejską zawartość sylimaryny w standaryzowanym suchym ekstrakcie ostropestu znajduje się w zakresie 30–65%. Zawartość

Analysis of drugs and dietary supplements with the fruit of the milk thistle extract using high-performance liquid · *Silybum marianum* (L.) Geartner is a pharmacopoeial plant material known mainly for its beneficial effects on liver function. Extract of ground milk thistle fruit contains 65–80% silymarin, which is the main ingredient of the extract. It is a complex of flavonolignans (Silybin A, Silybin B, Isosilybin A, Isosilybin B, Sylchristin, Isosylchristin and Silydianin) and active flavonoids (Taxifolin). In many studies, different quality of commercial silymarin preparations has been noticed. The aim of the work was chromatographic analysis (RP-HPLC) of drugs (5) and dietary supplements (12) with milk thistle extract available on the Polish pharmaceutical market. The total content of silymarin was consistent with declared value for the drugs tested, whereas there was a difference in the group of dietary supplements. In turn, percentage of individual components in the sample differed significantly for both the drugs and dietary supplements. The significant differences were also found in the recommended daily dose of individual preparations.

Keywords: milk thistle, dietary supplements, liquid chromatography, herbal medicinal products.

© Farm Pol, 2019, 75(1): 3–7

kompleksu sylimaryny odpowiada sumie ilości: sylibiny i sylidianiny – 20–45%, sylibiny A i sylibiny B – 40–65%, izosylibiny A i izosylibiny B – 10–20% [5]. Polifenolowa natura flawonolignanów zapewnia im właściwości antyoksydacyjne, co jest prawdopodobnie główną przyczyną właściwości hepatoprotekcyjnych całego wyciągu [6]. Surowiec ten jest wykorzystywany w leczeniu m.in. ostrego i przewlekłego

stanu zapalnego wątroby, w alkoholowym stłuszczeniu wątroby (ALD) [7], chorobach związanych z nadużywaniem alkoholu oraz uszkodzeniach wywołanych przez leki lub wysoce toksyczne związki np. podczas zatrucia *Amanita phalloides* [2]. *In vitro* związki te wykazują także działanie przeciwzapalne, immunostymulujące i przeciwnowotworowe. Sylimaryna blokuje wszystkie etapy karcenogenezy (inicjację, promocję i progresję), a połączenie chemioterapii z jednoczesnym podawaniem ekstraktu ostropestu plamistego powoduje zmniejszenie toksyczności terapii bez osłabienia jej działania [8]. Wyciąg ten może zostać wykorzystany w profilaktyce i leczeniu nowotworów prostaty [9]. Ponadto, surowiec ma zastosowanie w leczeniu chorób sercowo-naczyniowych, zapobiega pojawieniu się nadciśnienia tętniczego wywołanego stresem oksydacyjnym oraz miażdżycą naczyń [10]. Jednocześnie, preparaty ostropestu są bezpieczne i dobrze tolerowane, nie powodują poważnych skutków ubocznych, z wyjątkiem łagodnych reakcji żołądkowo-jelitowych i alergicznych.

Istnieje wiele parametrów wpływających na ilościowy i jakościowy skład kompleksu sylimaryny. Należą do nich m.in. odmiana *Silimum marianum*, geograficzna lokalizacja uprawy (właściwości fizyczne gleby, pogoda) oraz warunki agronomiczne (czas siewu, nawożenie, nawodnienie, czas zbioru, dojrzałość nasion) [11]. W badaniach zauważono różnice stosunków poszczególnych składników pomiędzy preparatami Legalon (Madaus, Niemcy) a produktami z Chin (Panjin Second Pharmaceutical Factory, Chiny oraz Yiganling tablets, Beijing Fourth Pharmaceutical Factory, Chiny) [12]. Znaczące różnice stwierdzono również w zawartości siedmiu składników sylimaryny w suplementach diety i herbatach ziołowych obecnych na czeskim rynku farmaceutycznym [13]. Badania przeprowadzone w Wielkiej Brytanii wykazały brak spójności w skuteczności terapeutycznej nalewek z ekstraktem ostropestu plamistego, przepisywanych przez lekarzy w schorzeniach wątroby. Sądzi się, że wynika to ze zmiennej zawartości składników sylimaryny w tych nalewkach, co może być spowodowane brakiem regulacji procesu produkcji oraz stosowaniem przez niektórych producentów zbyt niskiego stężenia etanolu w procesie ekstrakcji [2]. W Polsce ostropest plamisty, jak również wiele innych surowców roślinnych, występuje nie tylko w postaci leków, ale także suplementów diety. Zgodnie z obowiązującymi w Polsce przepisami, suplementy diety są definiowane jako produkty spożywcze, a sektor ten jest w ostatnim czasie jedną z najszybciej rozwijających się gałęzi przemysłu. Niestety wiele badań dotyczących kontroli jakości tych preparatów donosi o ich niskiej jakości. Przykładem mogą być preparaty ziołowe zawierające

ekstrakt z liści miłorzębu japońskiego [14] oraz wiele innych [15–18].

Na polskim rynku owoce ostropestu plamistego występują w postaci mielonej (odtłuszczonej lub nie), leków (tabletki, kapsułki) i suplementów diety najczęściej zawierających ekstrakt tego surowca.

Celem pracy była analiza chromatograficzna leków i suplementów diety zawierających ekstrakt z ostropestu plamistego, sprawdzenie jak bardzo poszczególne preparaty różnią się między sobą pod względem jakościowego i ilościowego składu sylimaryny oraz czy istnieją znaczące różnice pomiędzy grupą leków i suplementów diety.

Materialy i metody

Materiał badany stanowiło 5 leków i 12 suplementów diety z wyciągiem z owoców ostropestu plamistego dostępnych na polskim rynku farmaceutycznym. Zawartość tabletki lub kapsułki zmikronizowano, następnie odważono 0,05 g proszku i ekstrahowano 4 ml 80% metanolu w temperaturze pokojowej przez 1 h. Tak przygotowany ekstrakt sączone i rozcieńczano czterdziestokrotnie za pomocą mieszaniny 25% acetonitrylu i 0,2% kwasu mrówkowego.

Oznaczenia wykonano metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z wykorzystaniem chromatografu: SHIMADZU LC-20 AD Prominence z detektorem spektrofotometrycznym (DAD). Rozdział prowadzono w odwróconym układzie faz (RP-HPLC) na kolumnie chromatograficznej GraceSmart C18 o długości 150 mm, ID 4,6 mm i wielkości ziaren 5 µm. Jako eluentu użyto acetonitrylu (faza A) oraz 0,2% roztworu kwasu mrówkowego (faza B), przy przepływie 0,8 ml/min, wg gradientu: 0–10 min – 82% fazy A, 18% fazy B; 10–12 min – 70% fazy A, 30% fazy B; 13–15 min – 82% fazy A i 18% fazy B. Całkowity czas analizy wynosił 15 min. Rejestrację prowadzono przy długości fali $\lambda=289$ nm. Związki identyfikowano na podstawie widm w zakresie od 200 do 600 nm oraz czasów retencji porównanych z wzorcami. Krzywą wzorcową wykonano na podstawie 7 poziomów stężeń wzorca (Silymarin, S0292, Sigma-Aldrich) i 5 równoległych oznaczeń każdego z nich. Sylibinę A i B oraz taksyfolinę zidentyfikowano na podstawie widma w zakresie 220–400 nm oraz porównania czasu retencji z wzorcem (Silybin, 02000585 Sigma-Aldrich; Taxifolin, 78666, Sigma-Aldrich).

Wyniki i omówienie

Analiza ilościowa

Chromatograficzny profil otrzymany dla wzorca sylimaryny wskazuje na obecność dziewięciu głównych pików przy różnych wartościach czasów

retencji (t_R) (**rycina 1**). Piki F i G zostały zidentyfikowane jako sylibina A i B, a pik A jako taksyfolina.

Opracowana metoda została zastosowana do określenia związków zawartych w ekstrakcie z *Silybum marianum* w ziołowych produktach leczniczych i suplementach diety obecnych na polskim rynku farmaceutycznym. Ilości silymaryny oznaczonej w preparatach w porównaniu z deklaracją producenta przedstawiono w **tabeli 1**.

Zgodnie z Farmakopeą Europejską, zawartość silymaryny w suchym ekstrakcie jest sumą wszystkich analizowanych związków z wyjątkiem taksyfoliny (która jest flawonoidem, a nie flawonolignanem). Z tego powodu łączną zawartość silymaryny we wszystkich analizowanych preparatach, którą podano w **tabeli 1**, obliczono jako sumę wszystkich pików z chromatogramu bez uwzględniania ilości taksyfoliny (pik A). Jak widać, całkowita zawartość silymaryny nie we wszystkich analizowanych próbkach jest zgodna z deklaracją producenta na opakowaniu. Wyniki pokazały, że w przypadku leków (próbki L1–L5) zawartość silymaryny jest zgodna z deklaracją producenta w ulotce. W przypadku suplementów diety (próbki oznaczone literą S), dla preparatów S1, S2, S5, S7, S8 i S10 obliczona zawartość silymaryny tylko nieznacznie odbiega od deklaracji producenta na opakowaniu. Niestety dla preparatów S3 i S11, obliczona zawartość silymaryny jest znacznie mniejsza i stanowi 40,58 mg dla preparatu S3 (deklaracja producenta 80 mg) oraz 21,45 mg dla preparatu S11 (deklaracja producenta 70 mg). Dla preparatów S4 i S6 zawartość silymaryny jest większa niż deklaruje producent na opakowaniu. Natomiast preparat S9 jest jedynym suplementem diety, który nie zawiera ekstraktu tylko zmielone owoce ostropestu plamistego. Podobnie próbka oznaczona jako M składa się ze zmielonych, odtłuszczonych owoców ostropestu plamistego, dostępnych w polskich aptekach. Wyniki analizy dla preparatów S9 i M są podobne, co świadczy o ich zbliżonym składzie. Procentowa zawartość poszczególnych składników w próbce różniła się znacznie zarówno pomiędzy preparatami o statusie leku, jak i wśród suplementów diety (**rycina 2**).

Ekstrakty silymaryny w preparatach L1, L2, L3 oraz S3, S9, S12 i M charakteryzują się wysoką całkowitą zawartością sylibiny A i B (42,48–50,11%). Najwyższy całkowity udział sylibiny A i B stwierdzono w lekach L2 i L3, które pochodzą od tego samego producenta. Dodatkowo obliczono stosunek pól powierzchni pików sylibiny B do sylibiny A (**rycina 3**). Dla leków stosunek ten mieści się w granicach od 1,6 do około 2,4. W przypadku większości suplementów uzyskano podobne wartości, jedynie dla S1 i S11 stosunek ten wynosił odpowiednio 2,7 i 3,2. Wyniki te potwierdzają

Rycina 1. Chromatogram wzorca silymaryny (Silymarin, S0292, Sigma-Aldrich).

Figure 1. Chromatogram of a silymarin standard (Silymarin, S0292, Sigma-Aldrich).

wcześniejsze badania nad zmiennością różnych komercyjnych preparatów silymaryny [2, 5, 11, 12], które mogą być związane z różnicami w warunkach wzrostu roślin *S. marianum* [11, 19] lub ogólnymi niespójnościami w procedurach ekstrakcji/przetwarzania obserwowanymi, w przypadku wielu produktów ziołowych. [14,20,21] Z badań biologicznych z użyciem preparatów *S. marianum* wynika konieczność uwzględnienia zmiennej zawartości flawonolignanów i flawonoidów w poszczególnych partiach tego surowca [11].

Tabela 1. Porównanie zawartości silymaryny w badanych preparatach oznaczoną metodą HPLC z informacją z ulotki lub opakowania.

Table 1. A comparison of silymarin content in studied preparations determined by HPLC method with leaflet or package information.

Kod	Ilość silymaryny		Kod	Ilość silymaryny	
	deklaracja producenta [mg]	analiza HPLC [mg]±SD ¹		deklaracja producenta [mg]	analiza HPLC [mg]±SD
L1	70	69,02±1,01	S5	35	33,89±2,18
L2	215–350	257,18±1,27	S6	35	47,08±1,51
L3	215–350	233,16±1,91	S7	100	94,98±8,37
L4	231–375	246,22±3,36	S8	80	76,40±3,93
L5	70	71,56±2,36	S9	brak inf., zmielone owoce	15,30±0,95
S1	100	95,67±1,75	S10	70	63,86±2,65
S2	80	73,60±4,43	S11	70	21,45±0,11
S3	80	40,58±0,99	S12	brak inf.	29,11±1,46
S4	34	43,05±1,41	M	brak inf., zmielone owoce	12,19±1,01

¹ SD – odchylenie standardowe (standard deviation)

Rycina 2. Procentowa zawartość pól powierzchni poszczególnych pików z chromatogramu w stosunku do sumy pól powierzchni pików (B-H).

Figure 2. Percentage of surface areas of individual peaks from the chromatogram in relation to the sum of the area of peaks (B-H).

Rycina 3. Stosunek pól powierzchni sylibiny B do sylibiny A.

Figure 3. Peak area ratio of Silybin B to Silybin A.

Analizując informacje podane przez producentów leków i suplementów diety, zauważono znaczące różnice w zalecanej dziennej dawce badanych preparatów. Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) za dawkę terapeutycznie skuteczną uznaje 200–400 mg sylimaryny w przeliczeniu na sylibinę, na dobę. [22] Takie dawkowanie jest zalecane

w przypadku leków L2, L3 i L4, w trzech dawkach podzielonych. Dla leków L1, L5 producent zaleca dawkowanie 210 mg sylimaryny na dobę (bez przeliczenia na sylibinę). W pozostałych preparatach (S3–S8) zaleca się stosowanie od 34 do 100 mg sylimaryny w dawce jednorazowej lub 200 mg (S1), 160 mg (S2), 140 mg (S10) sylimaryny w dwóch

dawkach podzielonych. Dawkowanie preparatów S1–S8, S10 oraz S11 może skutkować ich znikomą skutecznością terapeutyczną.

Podsumowując, można wnioskować, że przeprowadzona analiza ilościowa badanych preparatów z ekstraktem ostropestu plamistego wykazała, że deklaracja producenta jest zgodna z rzeczywistym składem preparatu tylko w przypadku leków. Dla badanych suplementów diety zauważono liczne różnice pomiędzy informacją zawartą na opakowaniu a oznaczoną ilością silymaryny. Procentowa zawartość poszczególnych składników różni się zarówno dla leków, jak i suplementów, co może wynikać z geograficznej lokalizacji uprawy surowca, warunków agronomicznych oraz różnic w procedurach ekstrakcji i przetwarzania surowca roślinnego.

Badania zostały sfinansowane w ramach UPB514 (Wydział Farmaceutyczny CM UMK).

Otrzymano: 2018.12.27 · Zaakceptowano: 2019.01.10

Piśmiennictwo

- Khan M.A., Blackshaw R.E., Marwat K.B.: Biology of milk thistle (*Silybum marianum*) and the management options for growers in north-western Pakistan. *Weed Biol. Manag.* 2009, 9: 99–105.
- Pendry B.A., Kemp V., Hughes M.J., Freeman J., Nuhua H.K., Sanchez-Medina A., Corcoran O., Galante E.: Silymarin content in *Silybum marianum* extracts as a biomarker for the quality of commercial tinctures. *J. Herb. Med.* 2017, 10: 31–36.
- Graf T.N., Wani M.C., Agarwal R., Kroll D.J., Oberlies N.H.: Gram-scale purification of flavonolignan diastereoisomers from *Silybum marianum* (milkthistle) extract in support of preclinical in vivo studies for prostate cancer chemoprevention. *Planta Med.* 2007, 73: 1495–1501.
- 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. *J. Chromatogr.* 2006, A1116: 57–68.
- Csupor D., Csorba A., Hohmann J.: Recent advances in the analysis of flavonolignans of *Silybum marianum*. *J. Pharmaceut. Biomed. Analysis* 2016, 130: 301–317.
- Wellington K., Jarvis B.: Silymarin: a review of its clinical properties in the management of hepatic disorders. *BioDrugs* 2001, 15: 465–489.
- Kolota A.: The possibilities of silymarin extract use in alcoholic liver disease – a literature review., *Alcoholism and Drug Addiction/Alcoholism i Narkomania* 2017, 30: 137–154.
- Ramasamy K., Agarwal R.: Multitargeted therapy of cancer by silymarin. *Cancer Letters* 2008, 269: 352–362.
- Davis-Searles P.R., Nakanishi Y., Kim N.C., 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 endpoints in human prostate carcinoma cells. *Cancer Research* 2005, 65: 4448–4457.
- Taleba A., Ahmada K.A., Ihsanb A.U., Qua J., Lina N., Hezame K., Kojua N., Huia L., Qilonga D.: Antioxidant effects and mechanism of silymarin in oxidative stress induced cardiovascular diseases. *Biomed. Pharmacother.* 2018, 102: 689–698.
- Chambers Ch. S., Holečková V., Petrasková L., Biedermann D., Valentová K., Buchta M., Křena V.: The silymarin composition... and why does it matter??? *Food Res. Int.* 2017, 100: 339–353.
- Ding T., Tian S., Zhang Z., Gu D., Chen Y., Shi Y., Sun Z.: Determination of active component in silymarin by RP-LC and LC/MS. *J. Pharmaceut. Biomed. Analysis* 2001, 26: 155–161.
- Fibigr J., Satinsky D., Solich P.: A new approach to the rapid separation of isomeric compounds in a *Silybum marianum* extract using UHPLC core-shell column with F5 stationary phase. *J. Pharmaceut. Biomed. Analysis* 2017, 134: 203–213.
- Wohlmuth H., Savage K., Dowell A., Mouatt P.: Adulteration of Ginkgo biloba products and a simple method to improve its detection. *Phytomedicine* 2014, 21: 912–918.
- Brabcová I., Kovářová L., Satinsky D., Havlíková L., Solich P.: A fast HPLC method for determination of vitamin E acetate in dietary supplements using monolithic column. *Food Anal. Method.* 2013, 6: 380–385.
- Fibigr J., Satinsky D., Solich P.: A study of retention characteristics and quality control of nutraceuticals containing resveratrol and polydatin using fused-core column chromatography. *J. Pharmaceut. Biomed. Analysis* 2016, 120: 112–119.
- Satinsky D., Jägerová K., Havlíková L., Solich P.: A new and fast HPLC method for determination of rutin, trolox, diosmin and hesperidin in food supplements using fused-core column technology. *Food Anal. Method.* 2013, 6: 1353–1360.
- Satinsky D., Pospíšilová M., Sladkovsky R.: A new gas chromatography method for quality control of methylsulfonylmethane content in multicomponent dietary supplements. *Food Anal. Method.* 2014, 7: 1118–1122.
- Shokrpour M., Mohammadi S.A., Moghaddam M., Ziai S.A., Javanshir A.: Variation in flavonolignan concentration of milk thistle (*Silybum marianum*) fruits grown in Iran. *J. Herbs Spices Med. Plants* 2008, 13: 55–69.
- Booker A., Suter A., Krnjic A., Strassel B., Zloh M., Said M., Heinrich M.: A phytochemical comparison of saw palmetto products using gas chromatography and ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy metabolomic profiling. *J. Pharm. Pharmacol.* 2014, 66: 811–822.
- Harker M.R., Henderson G.L., Gershwin M.E., Stern J.S., Hackman R.M.: Variability in commercial ginseng products: an analysis of 25 preparations. *Am. J. Clin. Nutr.* 2001, 73: 1101–1110.
- Fructus Sylibi Mariae, WHO Monographs on Selected Medical Plants, 2004, 2: 30–310, <http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Js4927e/29.html#Js4927e.29>, [dostęp: 11.07.2018].