Stanovení obsahu silybinu v potravních doplňcích obsahujících silymarin

Martin Poruba, Zuzana Matušková

Ústav farmakologie, Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci

Prezentovaná studie měla za cíl porovnat obsah silybinu ve vybraných potravních doplňcích obsahujících silymarin dostupných v České republice. Stanovení silybinu bylo provedeno pomocí HPLC/UV. Naše výsledky ukazují, že většina potravních doplňků obsahuje silybin v referenčním rozmezí 20–40 %. Výrobky NaturProdukt® Silymarin forte s obsahem 40 % silybinu ($80,00 \pm 0,50$ mg) a Nefdesanté® Silymarin ostropestřec s obsahem 33 % silybinu ($81,58 \pm 0,14$ mg) patří mezi výrobky s vysokým obsahem této přírodní látky. Na druhou stranu nejméně silybinu bylo naměřeno u přípravku WALMARK® Ostropestřec mariánský (< 20 %). Výsledky naznačují, že většina z testovaných potravních doplňků je kvalitní a obsahuje deklarované množství obsahových látek.

Klíčová slova: silymarin, silybin, potravní doplňky.

Determination of silybin content in food supplements containing silymarin

The aim of this study was to determine the amount of silybin in selected nutraceuticals containing silymarin available in the Czech Republic. The determination of silybin was performed using HPLC/UV. Results show that almost all of the tested nutraceuticals contain the sufficient amount of silybin (range 20–40 %). NaturProdukt® Silymarin forte contained 40 % of silybin (80.00 ± 0.50 mg) and Nefdesanté® Silymarin ostropestřec contained 33 % of silybin (81.58 ± 0.14 mg). Both can be included among the products with high silybin content. On the other hand, the lowest amount of silybin was measured in WALMARK® Ostropestřec mariánský (< 20 %). Our results suggest that almost all of the tested products are of high quality and contain the declared amount of constituents.

Key words: silymarin, silybin, nutraceuticals.

Úvod

Potravní doplňky patří mezi velmi oblíbené produkty nejen v České republice. Mnohé z nich obsahují přírodní látky, které mohou příznivě působit na lidské zdraví, proto slouží jako doplněk standardní léčby. Mezi využívané látky patří bezesporu silymarin, což je extrakt získávaný z plodů ostropestřce mariánského (*Silybum marianum*, Asteraceae) a tvoří zhruba 1,5–3 % hmotnosti suché drogy. Tento extrakt je bohatý na flavonolignan, z nichž nejdominantnější je zastoupený silybin, který je směsí dvou diastereoizomerů, a tvoří 50–70 % silymarinu. Dále se v silymarinu nachází isosilybin, silychristin, isosilychristin, silydianin, silimonin, dále pak flavonoidy kvercetin, taxifolin a další látky (1).

Ostropestřec mariánský je již po staletí znám a užíván pro své příznivé účinky u chorob jater a žlučníku (2). Studovány jsou také účinky silymarinu u metabolických chorob, u nichž tento extrakt příznivě ovlivňuje plazmatické koncentrace lipidů a glukózy (3, 4). Nadějně se rovněž jeví účinky silymarinu u hepatitidy C, ale osvědčil se i jako podpůrný prostředek u hepatitidy A a E (5, 6). Samostatně využití našel také čistý silybin, který je využíván jako antidotum při otravách jedovatou muchomůrkou zelenou (7).

Cílem této studie je stanovit obsah silybinu A a B u náhodně vybraných doplňků stravy dostupných v České republice. Naším cílem není rozdělit jednotlivé diastereoizomery silybinu, ale stanovit obsah celkového silybinu a porovnat

naše výsledky s údaji uváděnými na obalech jednotlivých přípravků. Silybin byl vybrán s ohledem na jeho dominantní zastoupení z komplexu flavonolignanů a také z toho důvodu, že je pravděpodobně zodpovědný za účinky celého extraktu (8). Přestože silybin tvoří zhruba polovinu celého extraktu, v konečném výrobku se jej nachází pouze 20–40 % (9, 10). Na různém poměru jednotlivých složek se může podílet zejména použitá metoda extrakce (11).

Ke stanovení koncentrace silybinu ve vybraných přípravcích byla vybrána vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) s UV detekcí – metoda, která umožní rozdělit, a tedy i zvláště detekovat jednotlivé složky silymarinu. Vzhledem k tomu, že na obalech není uváděna

koncentrace silybinu, je nutné určit také jeho procentuální zastoupení z obsahu silymarinu uvedeného na obalu výrobku.

Materiál a metody

Potravní doplňky a chemikálie

Použité potravní doplňky byly nakoupeny v lékárnách v Olomouci. Konkrétně se jednalo o WALMARK® Ostropestřec mariánský (č. š.: LD7C1933), SWISS® Ostropestřec mariánský FORTE (č. š.: L810098670502), MedPharma® Ostropestřec (č. š.: nenalezeno), REVITAL® Očista jater (č. š.: L35952), Dr. Max® Silymarin Premium (č. š.: L1117032901), DaVinci® Silymarin Duo (č. š.: L37045), Liftea® Ostropestřec (č. š.: L011116), NaturProdukt® Silymarin forte (č. š.: L1708004), Nefdesanté® Silymarin ostropestřec (č. š.: nenalezeno).

Standard silybinu (směs diastereoizomerů A a B) byl zakoupen od firmy Sigma-Aldrich spol., s. r. o. (Praha, Česká republika), acetonitril (ACN), methanol (MeOH), kyselina mravenčí (HCOOH) a destilovaná voda byly zakoupeny od firmy VWR International, s. r. o. (Stříbrná Skalice, Česká republika).

Stanovení obsahu silybinu

Tablety potravních doplňků byly rozdrceny v třecí misce tloučkem a rozdrcená směs byla kvantitativně převedena do odměrné baňky. V případě tobolek byl jejich obsah vysypán a vypláchnut do odměrné baňky. Prášek byl za pomoci ultrazvuku rozpuštěn ve směsi ACN : voda (6 : 4, v/v). Z této směsi bylo odebráno 200 µl pro následnou analýzu HPLC dle Gunaratna et Zhang (12) s mírnými modifikacemi. Složky silymarinu byly separovány na koloně LiChrospher 100 RP-18 (250 mm × 4,6 mm i. d.) s velikostí částic 5 µm (Merck, Darmstadt, Německo) při teplotě 40 °C. Při separaci byla použita mobilní fáze ACN : MeOH : 0,1% HCOOH (27 : 5 : 68, v/v) s průtokem 1 ml/min. Detekce probíhala spektrofotometricky na systému HPLC (Prominence LC-20 A; Shimadzu, Kyoto, Japonsko) při 289 nm.

Výsledky

Silybin byl pomocí metody HPLC odseparován od zbylých složek silymarinu, a tím mohla být určena jeho koncentrace v jednotlivých přípravcích. Pro přesné stanovení obsahu silybinu

Tab. 1. Složení náhodně vybraných potravních doplňků uvedené na obalu jednotlivých přípravků.

Potravní doplněk	Obsah v jedné tabletě/tobolce (dle výrobce)	Předpokládaný obsah silybinu v jedné tabletě (mg)
WALMARK® Ostropestřec mariánský	<i>Silybum marianum</i> extrakt ze semen 5 : 1–200 mg (odpovídá 1000 mg)	40,0–80,0
SWISS® Ostropestřec mariánský FORTE	Ostropestřec mariánský (standardizovaný extrakt ze semen 25 : 1,80 % silymarinu) 250 mg (odpovídá 200 mg silymarinu)	40,0–80,0
MedPharma® Ostropestřec	Ostropestřec 125 mg (s 80% obsahem silymarinu, tj. 100 mg), černá ředkev 100 mg, smetánka lékařská 100 mg, vojtěška 100 mg, červená řepa 75 mg, cholin 75 mg, inositol 75 mg	20,0–40,0
REVITAL® Očista jater	Extrakt z ostropestřce mariánského 150 mg (120 mg silymarinu)	24,0–48,0
Dr. Max® Silymarin Premium	250 mg 80% extraktu ostropestřce mariánského (tj. 200 mg silymarinu), cholin 82,5 mg	40,0–80,0
DaVinci® Silymarin Duo	Směs silymarinových flavonolignanů 104 mg, suchý extrakt šišáku bajkalského 55 mg, inulin 149 mg	20,8–41,6
Liftea® Ostropestřec	extrakt z květu ostropestřce 2400 mg (<i>silybum marianum</i> extrakt 40 : 1–60 mg), extrakt k natí kopřivy dvoudomé 500 mg (<i>Urtica dioica</i> extrakt 10 : 1–50 mg), extrakt z kořene smetánky lékařské 125 mg (<i>Taraxacum officinale</i> extrakt 10 : 1–12,5 mg), cholin 100 mg, L-methionin 25 mg, tokoferol 5 mg, pyridoxin 1 mg, thiamin 1 mg	12,0–24,0
NaturProdukt® Silymarin forte	silymarin 250 mg (standardizovaný na 80 % silymarinového komplexu), vitamin D3 10 µg	40,0–80,0
Nefdesanté® Silymarin ostropestřec	<i>Silybum marianum</i> extrakt 250 mg	50,0–100,0

Obr. 1. Kalibrační křivka. Závislost mezi koncentrací silybinu a plochou píku na chromatogramu. $R^2 = 0,99997$

v silymarinu byla nejprve vytvořena kalibrační křivka. Vynesením plochy píků v závislosti na koncentraci (0,001–1 mg/ml) byla získána lineární

kalibrační křivka s hodnotou spolehlivosti $R^2 = 0,99997$ (Obrázek 1). Byla testována rozpustnost silybinu v různých rozpouštědlech při různé

době rozpouštění, aby se předešlo případným změnám v koncentraci pro nestabilitu anebo nedokonalému uvolnění silybinu z těžce rozpustných pomocných látek.

Jednotlivé preparáty s obsahem silymarinu byly testovány z hlediska absolutního množství směsi silybinu A a B a také z hlediska procentuálního zastoupení silybinu v deklarovaném množství extraktu. Nejvyšší množství silybinu bylo naměřeno u přípravku Nefdesanté® Silymarin ostropestřec, v němž bylo naměřeno celkové množství 81,58 mg směsi silybinu. Druhé nejvyšší množství silybinu bylo stanoveno u přípravku NaturProdukt® Silymarin forte, konkrétně 80,00 mg. Nejméně směsi obou silybinů bylo naměřeno u produktu WALMARK® Ostropestřec mariánský.

U většiny analyzovaných preparátů byl obsah silybinu v rozmezí 20–40 %. Do tohoto rozmezí se nevešel pouze přípravek WALMARK® Ostropestřec mariánský a doplněk DaVinci® Silymarin Duo, u kterého silybin tvořil méně než 20 % celkového množství silymarinu uvedeného na obalu. Procentuálně nejvyšší zastoupení silybinu bylo u přípravku NaturProdukt® Silymarin forte, v němž silybin tvořil celých 40 %. Veškeré výsledky jak absolutního množství silybinu, tak také jeho procentuálního zastoupení dle uvedeného množství silymarinu na obale, s výjimkou přípravků s obsahem silybinu pod 20 %, jsou uvedeny v tabulce 2.

Diskuze

Tato práce přispívá do problematiky obsahu přírodních látek v potravních doplňcích, u nichž je garance jednotlivých chemicky definovaných složek vždy složitá. Obecným problémem potravních doplňků s obsahem přírodních látek je variabilita obsahu složek v závislosti na použitém zdroji rostliny a samozřejmě také na použité metodě extrakce (13, 14). Dostupná literatura uvádí, že obsah jednotlivých flavonolignanů v rostlině se významně liší v závislosti na klimatických podmínkách, v nichž je ostropestřec mariánský pěstován. Z tohoto důvodu se množství silybinu v silymarinovém komplexu může v jednotlivých přípravcích i v rámci různých šarží lišit. Variabilitu v zastoupení silybinu přičítáme zejména tomuto faktoru (15).

LITERATURA

1. Abenavoli L, Capasso R, Milic N, Capasso F. Milk thistle in liver diseases: past, present, future. *Phytotherapy research*. PTR. 2010; 24(10): 1423–1432.
2. Rainone F. Milk thistle. *American family physician*. 2005; 72(7): 1285–1288.

Tab. 2. Množství silybinu u jednotlivých preparátů s obsahem silymarinu. Hodnoty jsou uvedeny jako průměr ze třech měření. Tabulka rovněž znázorňuje procentuální zastoupení silybinu z uvedeného množství silymarinu na obalu potravního doplňku

Potravní doplněk	Obsah silybinu v jedné tabletě/tobolce (mg)	Procentuální zastoupení silybinu z deklarovaného množství silymarinu (%)
WALMARK® Ostropestřec mariánský	< 40,00	< 20,00
SWISS® Ostropestřec mariánský FORTE	65,03 ± 0,06	32,52 ± 0,03
MedPharma® Ostropestřec	34,83 ± 0,28	34,83 ± 0,29
REVITAL® Očista jater	34,97 ± 0,05	29,14 ± 0,05
Dr. Max® Silymarin Premium	65,25 ± 0,25	32,63 ± 0,13
DaVinci® Silymarin Duo	< 20,80	< 20,00
Liftea® Ostropestřec	13,42 ± 0,52	22,36 ± 0,87
NaturProdukt® Silymarin forte	80,00 ± 0,50	40,00 ± 0,25
Nefdesanté® Silymarin ostropestřec	81,58 ± 0,14	32,63 ± 0,06

V rámci studie jsme stanovovali celkové zastoupení dvou stereoizomerů silybinu ve vybraných potravních doplňcích s obsahem silymarinu. Pro porovnání jednotlivých přípravků jsme zvolili zejména poměrné zastoupení silybinu z celkového množství silymarinu uvedeného na obalu výrobku. Z výsledků vyplývá, že zastoupení silybinu A i B v silymarinovém komplexu u většiny vybraných potravních doplňků spadá do rozmezí 20–40 %. Dva výše uvedené přípravky tohoto rozmezí nedosáhly. Naše výsledky jsou tedy v souladu s analýzou přípravků s obsahem silymarinu, která byla provedena ve Spojených státech amerických v roce 2007 (9).

Pro úplnost je třeba uvést, že jsme nestanovovali celkové množství extraktu silymarinu, které je uváděno na obalu potravních doplňků, ale pouze jeho definovanou součást. Nestanovovali jsme ani ostatní flavonolignany jako například isosilybin, nebo flavonoidy, jako je kvercetin. Z našich výsledků tedy nelze odvozovat celkové množství ani kvalitu použitého extraktu silymarinu v jednotlivých vybraných potravních doplňcích. Výsledky naší studie také nevypovídají o možných terapeutických účincích jednotlivých preparátů, ani o skutečném vstřebaném množství komplexu. O silymarinu i silybinu je známo, že tyto látky se velmi těžce rozpouštějí ve vodě, a mají tak omezenou biologickou

dostupnost. V naší studii jsme proto tablety rozpouštěli ve směsi rozpouštědel, abychom dosáhli co nejvyšších výtěžků. Za zmínku stojí také informace o doporučených terapeutických dávkách jednotlivých přípravků, které jsou pravděpodobně velmi nízké. Studie naznačují, že pro získání terapeutického účinku je vhodnější volit dávky vyšší, a to až v přibližné denní dávce 500 až 1000 mg (16).

Závěrem můžeme říci, že většina analyzovaných potravních doplňků obsahuje směs flavonolignanů silybinu A a B v obvyklém množství přepočítaném na celkový obsah extraktu silymarinu. I přes využívání standardizovaných extraktů se jednotlivé složky komplexu liší ve svém kvantitativním složení a rozdílné přípravky nemusí být nutně rozdílné v kvalitě. Vzhledem k možnému nesouladu obsahu silymarinu a silybinu by se zdálo vhodnější na obalu jednotlivých přípravků neuvádět pouze množství celkového extraktu silymarinu, ale také množství silybinu. Díky této informaci by orientace mezi potravními doplňky s obsahem silymarinu byla mnohem snazší. I přes kolísavé zastoupení silybinu mohou, dle názoru autorů, být tyto přípravky vhodným doplňkem při chorobách gastrointestinálního traktu, případně při některých metabolických chorobách.

Autoři děkují grantu IGA_LF_2018_011.

2013; 58(3): 409–411.

6. Mihalčin M, Fašáneková L, ml., Husa P. Aktuální pohled na epidemiologii a přístupy k léčbě virových hepatitid A a E. *Klinická farmakologie a farmacie*. 2017; 31(1): 15–18.

7. Enjalbert F, Rapior S, Nouguier-Soule J, Guillon S, Amou-roux N, Cabot C. Treatment of amatoxin poisoning: 20-year retrospective analysis. *Journal of toxicology Clinical toxicology*. 2002; 40(6): 715–757.

8. Hackett ES, Twedt DC, Gustafson DL. Milk thistle and its derivative compounds: a review of opportunities for treatment of liver disease. *Journal of veterinary internal medicine*. 2013; 27(1): 10–16.

9. Lee JI, Narayan M, Barrett JS. Analysis and comparison of active constituents in commercial standardized silymarin extracts by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of chromatography B, Analytical technolo-*

gies in the biomedical and life sciences. 2007; 845(1): 95–103.

10. Bijak M. Silybin, a Major Bioactive Component of Milk Thistle (*Silybum marianum* L. Gaertn.)-Chemistry, Bioavailability, and Metabolism. *Molecules* (Basel, Switzerland). 2017; 22(11).

11. Chambers CS, Holečková V, Petrášková L, Biedermann D, Valentová K, Buchta M, et al. The silymarin composition... and why does it matter??? *Food Research International*. 2017; 100: 339–353.

12. Gunaratna C, Zhang T. Application of liquid chromatography-electrospray ionization-ion trap mass spectrometry to investigate the metabolism of silybinin in human liver microsomes. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. 2003; 794(2): 303–310.

13. Radjabian T, Fallah Huseini H. Anti-hyperlipidemic and anti-atherosclerotic activities of silymarins from cultivated and wild plants of *Silybum marianum* L. with different con-

tent of flavonolignans. *Iranian Journal of Pharmacology and Therapeutics*. 2010; 9(2): 63–67.

14. Poppe L, Petersen M. Variation in the flavonolignan composition of fruits from different *Silybum marianum* chemotypes and suspension cultures derived therefrom. *Phytochemistry*. 2016; 131: 68–75.

15. Graf TN, Cech NB, Polyak SJ, Oberlies NH. A validated UHPLC-tandem mass spectrometry method for quantitative analysis of flavonolignans in milk thistle (*Silybum marianum*) extracts. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2016; 126: 26–33.

16. Fathalah WF, Abdel Aziz MA, Abou El Soud NH, El Raziky MES. High Dose of Silymarin in Patients with Decompensated Liver Disease: A Randomized Controlled Trial. *Journal of interferon & cytokine research: the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*. 2017; 37(11): 480–487.