

Stanovení účinných látek silymarinu metodou kapalinové chromatografie (LC)

Úvod:

Silymarin je extrakt získaný ze semen ostropestřce mariánského (*Silybum marianum L.*). Ze 70-80 % je tvořen směsí flavonolignanů - silybinu A a B, isosilybinu A a B, silydianinu, silychristinu; a dalších látek jako je dehydrosilybin a taxifolin. Ostropestřec mariánský je široce využíván jako léčivá rostlina, zejména při onemocnění jater, pro významnou schopnost přispívat k regeneraci jaterní tkáně.

Přístroje a pomůcky:

Kapalinový chromatograf DIONEX UltiMate 3000 (Thermo Scientific), PC, laboratorní šrotovník, automatické pipety, běžné laboratorní sklo, odměrné nádoby a laboratorní vybavení.

Příprava roztoků:

Pro extrakci vzorků připravíme 1 litr směsi acetonu (LC grade) a metanolu (LC grade) (26:20, v/v). Jako mobilní fáze připravíme směsi metanolu (LC grade), acetonitrilu (LC grade) a redestilované vody s přídavkem kyseliny fosforečné 85 % (p.a.). Mobilní fáze A: 22 % CH₃OH (metanol) + 15 % CH₃CN (acetonitril) + 63 % H₂O + 0,5 % H₃PO₄ do 1 litrové zásobní lahve; mobilní fáze B: 40 % CH₃OH + 20 % CH₃CN + 40 % H₂O + 0,5 % H₃PO₄ (1 litr). Mobilní fáze přefiltrujeme přes nylonový filtr 0,45 μm a odplyníme pomocí ultrazvuku.

Pro kalibraci kvantitativního stanovení silymarinu připravíme zásobní roztoky taxifolinu (TX), silychristinu (SCH), silydianinu (SD), silybinu A a B (SB A,B) a silybininu A a B (ISB A,B) v metanolu. Z těchto zásobních roztoků připravíme směsný standard, jehož naředěním dále získáme směsné standardní roztoky o koncentracích cca 0,5 – 200 μg.ml⁻¹.

Příprava extraktu:

Semena ostropestřce mariánského rozemeleme na laboratorním šrotovníku. Do odměrné baňky o objemu 25 ml navážíme 1 g pomletého semene. K navážce přidáme 1 ml redestilované vody a necháme 1 hodinu stát. Dále přidáme 23 ml směsi acetonu a metanolu (26:20, v/v). Takto připravenou směs necháme míchat 1 hodinu pomocí ultrazvuku, poté následuje 12 hodinová macerace. Acetonmetanolovou frakci přefiltrujeme přes nylonový filtr (0,45 μm) a extrakt 6x naředíme (100 μl vzorku + 500 μl metanolu) do 1,5 ml vialky s plným víčkem.

Analýza vzorků a standardů:

Extrakty vzorků se analyzují pomocí metody vysoko-účinné kapalinové chromatografie. Separace účinných látek bude provedena na koloně Nucleosil C 18 o rozměrech 4,6 x 250 mm (zrnění 5 μm). Kolona bude spojena s předkolonou naplněnou sorbentem stejných vlastností jako v koloně. Chromatografie bude probíhat při 25 °C. Jako mobilní fáze použijeme směsi metanolu, acetonitrilu a vody s přídavkem kyseliny fosforečné. Gradient je následující: 0 min. – 100 % mobilní fáze A; 30 min. 100 % mobilní fáze B; 35 min. – 100 % A. Celkový čas analýzy je 40 minut. Rychlost průtoku mobilní fáze kolonou je 0,9 ml/min. Objem dávkovací smyčky je 20 μl. Detekce je provedena při vlnové délce 288 nm. Kvantitativní hodnocení provedeme pomocí externí kalibrace s použitím standardních roztoků.

Naměřená data vyhodnotíme pomocí chromatografického datasystému Chromeleon 7.2.