

Analiza pripravaka sikavice tankoslojnom kromatografijom (Silybum marianum (L.) Gaertn.)

Tučkar, Dubravka; Vrsalović, Mirjana; Kuštrak, Danica

Source / Izvornik: **Farmaceutski glasnik, 2003, 59, 303 - 310**

Journal article, Published version

Rad u časopisu, Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:741319>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-29**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Analiza pripravaka sikavice tankoslojnom kromatografijom (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.)

DUBRAVKA TUČKAR, MIRJANA VRŠALOVIĆ, DANICA KUŠTRAK

Trešnjevka laboratorij, d.o.o., Jukićeva 32, 10000 Zagreb
Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Thin-layer chromatographic analysis of milk thistle preparations – *Silybum marianum* (L.) Gaertn.

S u m m a r y – The milk thistle, *Silybum marianum* (L.) Gaertn. (= *Carduus marianus* L.) belong to the Asteraceae family. The plant is of widespread distribution in the Mediterranean area. It's fruits, *Fructus Cardui Mariae*, commonly known as seeds, were traditionally employed as herbal remedy, while nowadays they or their preparations in effective dosage are recognized as a modern phytomedicine. Wagner et al. (1968) found in fruits of the milk thistle a group of compounds named silymarin. Further studies showed that silymarin consists of four compounds: silibinin, isosilibinin, silicristin and silidianin. The term flavonolignans has been proposed for molecules of this structure.

Indications for silymarin therapeutic use are: toxic liver damage, supportive treatment in chronic inflammatory liver diseases and cirrhosis.

The aim of this research was to check up the presence of silymarin components in the plants cultivated in Croatia (in the open air). Thin-layer chromatography (TLC) was used for qualitative analysis of flavonolignans. The analysis showed the presence of silibinin, silicristin and silidianin with silibinin as the main component (ca. 50%) in the extracts of fruit. Components detected in the leaf extract seem to belong to flavonoid derivatives.

(Trešnjevka laboratorij, d.o.o., Jukićeva 32, 10000 Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia)

UVOD

Sikavica (*S. marianum*, Asteraceae) i preparati izrađeni na osnovi ekstrakata ove biljke, još su uvijek u vrhu fitofarmaka, što dokazuje i naslovna strana prospekta kojim je bio najavljen Kongres u Berlinu 2002. (Slika 1). Bio je to kongres znatno drukčijeg sadržaja od uobičajenih kongresa o istraživanju ljekovitog bilja i vrednovanju biljnih lijekova. Razlikovao se i po



Slika 1. Naslovna strana prospekta o Kongresu u Berlinu 2002.

tome, što su na njemu većinu sudionika predstavljali liječnici, klinički farmakolozi i toksikolozi. Farmaceutska struka i proizvođači bili su u manjini.

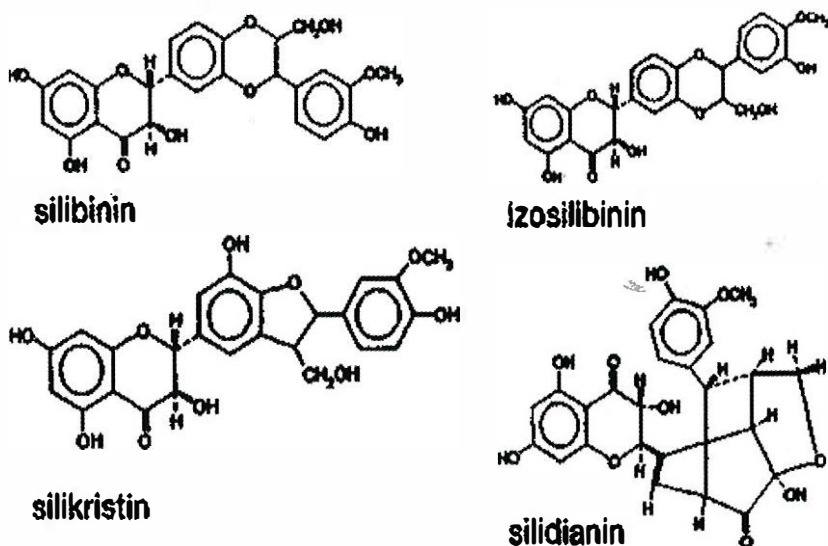
Zašto je sikavica još uvijek aktualna biljna sirovina? Razlog tome je učestalost jetrenih oboljenja za koja na europskom farmaceutskom tržištu postoje brojni biljni lijekovi izrađeni s ekstraktom plodova sikavice.

Sikavica je kod nas samoniklo rasprostranjena u Dalmaciji, u podnožju Biokova (1), kao i u Hercegovini, na suhim i sunčanim mjestima. Obično raste kraj putova, naselja, po željezničkim nasipima, posebice na toplim i kamenitim staništima. To je razgranata dvogodišnja, zeljasta biljka visine i do 1,5 m. Bogato je obrasla listovima koji su prošarani bijelim prugama. Cvjetne glavice su velike, ljubičaste ili purpurnocrvene boje. (Slika 2). Plodovi sikavice, *Fructus cardui mariae* (= *Silybi mariani fructus*), često pod neispravnim nazivom *Semen cardui mariae* (2) bili su upotrebljavani kao biljni lijek, a u novije vrijeme zbog znanstveno dokazanog terapijskog učinka ulaze u sastav biljnih lijekova koji se primijenjuju u terapiji oboljenja jetre. Iz plodova sika-



Slika 2. Sikavica – *Silybum marianum* (L.) Gaertn.
(sinonim: *Carduus marianus* L.) – Asteraceae (Madaus)

vice Wagner i suradnici su izolirali (1968) flavonoidni kompleks, kojeg su nazvali **silimarín**. Daljnja su istraživanja pokazala, da se kompleks sastoji od četiri izomera: **silibinin**, **izosilibinin**, **silikristin** i **silidianin** (slika 3). Ta četiri spoja strukturno pripadaju skupini flavonoida zvanj **flavonolignani** (3). U standardiziranim ljekovitim oblicima omjer izomera je: 50% silibinina, 12,5% izosilibinina, 25% silikristina i 12,5% silidianina.



Slika 3. Sastavnice silimarinskog kompleksa – flavonolignani

Zbog velike potražnje plodova na farmaceutskom tržištu, sikavica se plantažno uzgaja u srednjoj Europi, Ukrajini, sjevernoj Africi i Južnoj Americi. Poznate su plantaže u Mađarskoj, a pokušava se s uzgojem sikavice i u Poljskoj (4). Počeci uzgoja sikavice u Hrvatskoj obavljeni su na plantažama IPK-»Osijek«- Poljoprivredno-znanstveni centar (5).

Budući da je kemijski sastav neke biljke uvjetovan klimatskim i pedološkim faktorima, zanimao nas je sastav biološki aktivnih tvari u sikavici uzgojenoj u kontinentalnoj Hrvatskoj. Glavni cilj naših istraživanja bio je, ustanoviti kvalitativnom kromatografskom analizom prisutnost flavonolignana u listovima, budući da sikavica razvija veliku bio-masu (visoka i do 1,5 m i bogato obrasla listovima), koji bi se mogli upotrijebiti u čajnim mješavinama. Materijal za istraživanje predstavljali su listovi i plodovi uzgojenih biljaka, budući da se samonikle ne upotrebljavaju za industrijsku obradu. Neki od ispitivanih biljnih pripravaka izrađeni su prema propisu farmakopeje.

EKSPERIMENTALNI DIO

A. Biljni materijal

Materijal za analizu sastojao se od listova sikavice – *Cardui mariae* (= *Silybi mariani*) folium i zrelih plodova – *Cardui mariae* (= *Silybi mariani*) fructus.

B. Ekstrakti sikavice za ispitivanje

1. Metanolni ekstrakt listova

Jedan g praškasto usitnjenih listova i 10 ml metanola zagrijavano je 5 min na vodenoj kupelji pri 65°C. Ohlađeni ekstrakt je filtriran, uparen do suha, a zatim otopljen u 1 ml metanola.

2. Etilacetatni ekstrakt čajnog napitka

Čajni je napitak priređen na sljedeći način: 2 žlice usitnjenog lista sikavice preliveno je sa 500 ml vrele vode, ostavljeno 20 min uz povremeno mućkanje. Nakon hlađenja tekućina je uparena na 50 ml, a potom su flavonolignani izmućkani sa 3x10 ml etilacetata. Sakupljeni etilacetatni ekstrakti upareni su na volumen od 10 ml.

3. Etanolni ekstrakt listova priređen prema propisu farmakopeje (10) u monografiji »Tincturae«.

4. Etanolni ekstrakt plodova sikavice priređen prema propisu farmakopeje (10) u monografiji »Tincturae«.

5. Etanolni ekstrakt plodova priređen prema propisu farmakopeje (10) u monografiji »Extracta fluida«.

C. Identifikacija sastavnica silimarinskog kompleksa tankoslojnom kromatografijom

Kvalitativna kromatografska analiza uzoraka izvedena je prema propisu njemačke farmakopeje (DAB 9), za drogu »Mariendistelfrüchte«, *Cardui mariae fructus*.

Propis glasi:

Nepokretna faza: Silikagel 60 (gotove ploče)

Pokretna faza: mravlja kiselina, bezvodna + aceton + kloroform
(8,5 : 16,5 : 75)

Udaljenost: start – fronta : 10 cm

Reagensi za detekciju:

1. 1% otopina difenilboriloksietilamina u metanolu
2. 5% otopina makrogola 400 u metanolu
3. vizualizacija : UV_{365 nm}

Nakon razvijanja kromatograma, ploče se suše na zraku, zatim zagrijava 5 min pri 100 °C do 105 °C, još tople prskaju reagensom 1, a zatim reagensom 2. Nakon 30 min sprovodi se vizualizacija.

U pomanjkanju čiste supstancije silibinina, kao poredbenu supstanciju upotrijebili smo otopinu kavene kiseline, koja ima istu R_f vrijednost kao i silibinin (1,0 mg kavene kiseline otopi se u 10 ml metanola).

U namjeri da se sastavnice silimarinskog kompleksa što bolje odijele, modificiran je propis iz DAB 9 utoliko, što je proticanje pokretne faze povećano na 15 cm. Ostali uvjeti kromatografiranja nisu mijenjani.

REZULTATI I RASPRAVA

Neke su ljekovite biljke zadržale svoje mjesto u terapiji tijekom više stoljeća. Jedna od tih biljaka je i sikavica (*Silybum marianum*). Poznata je upotreba plodova sikavice još od ranog Srednjeg vijeka u liječenju jetrenih oboljenja. U to vrijeme sakupljani su plodovi samoniklih biljaka. Danas oni potječu isključivo iz uzgoja. Suvremene su analitičke metode pokazale, da sadržaj za terapiju odgovornih tvari kod pojedinih kultivara može jako varirati; i kvantitativno i kvalitativno. Sikavica se javlja u dva oblika s obzirom na boju cvjetova. Mnogo su češći primjerci s ljubičastim ili purpurnocrvenim cvjetovima, nego s bijelim (6). Šilješ i suradnici (5) navode da se sadržaj flavonolignana kreće od 2 do 5%, te da ih plodovi biljaka bijelih cvjetova sadrže više nego plodovi biljaka ljubičastih cvjetova. S obzirom na ekološke uvjete isti autori naglašavaju značaj tla, padalina i temperature. Uz obilne padaline i niske temperature, smanjuje se urod ploda i sadržaj aktivnih tvari; sikavica je biljka Sredozemlja; voli toplo i suho podneblje. Hammouda i surad. (6) također ukazuju na važnost vlage, pri uzgoju sikavice u Egiptu i dolini Nila, ali pri tome razmatraju i utjecaj mineralnih gnojiva. Sve to zajedno utječe na postotak silimarinskog kompleksa.

U literaturi postoji i podatak (7) da neki uzorci plodova iz uzgoja sadrže više silidianina nego silibinina. O količini silimarina kao i o broju sastavnica u kompleksu pišu u svojoj knjizi i engleski autori Phillipson i suradnici (8). Prema njihovim podacima, sadržaj silimarinskog kompleksa kreće se od 1,5 do 3%, a osim četiri, u literaturi citirana izomera, oni navode još i ove spojeve: silimonin, silandrin, silhermin, neosilihermin A i B i dr.

Navedeni autori (8) govore o uporabi listova sikavice u liječenju jetre, slezene i žuči, te o postojanju pripravaka izrađenih iz listova u ljekarničkoj praksi. Kao sastavnice listova navode flavonoide: apigenin, luteolin, kemferol i njihove glikozide. Isti autori tvrde, da silimarini nisu nađeni u listovima. Mi smo ovom podatku obratili osobitu pozornost. Navodi engleskih autora možda se odnose na biljke uzgojene u Engleskoj i u skladu su s podacima Šilješa i suradnika (5). Engleska obiluje vlagom, a i temperature su tijekom vegetacije biljaka niže nego u Slavoniji. Upitno je, koliki sadržaj silimarina mogu biljke metabolizirati uz takove ekološke uvjete. Za usporedbu, sadržaj flavonolignana u njihovim uzorcima iznosi 1,5 do 3% a u slavonskim 2 do 5%. Je li sadržaj silimarina u listovima samo jako nizak ili ga uopće nema? Naši su kromatogrami pokazali drukčiju sliku.

Za izolaciju silimarinskog kompleksa i određivanje njegovog sadržaja, većina znanstvenika upotrebljava metanol kao najpovoljnije otapalo.

Rezultati naših istraživanja i odjeljivanja pojedinih sastavnica iz analiziranih uzoraka vidljivi su na snimcima kromatograma (slike 4 i 5). Metodom tankoslojne kromatografije dokazana je prisutnost sastavnice silimarinskog

kompleksa u metanolnom i etanolnom ekstraktu listova sikavice. Na kromatogramu je uočena zona koja je nakon detekcije s reagensima fluorescirala žutozeleno i imala R_f vrijednost u istoj visini kao i zona metanolne otopine kavene kiseline (Slika 4).

Nadalje, kvalitativnom analizom na tankom sloju silikagela dokazani su flavonolignani u ekstraktima plodova sikavice. Na snimci kromatograma (Slika 5) uočeno je nekoliko dobro odijeljenih zona, koje su pri UV_{365nm} fluorescirale u nijansama žutozeleno boje. Od spomenutih zona dobro je uočljiva



Slika 4. Kromatogram sastavnica listova sikavice

Nepokretna faza: Silikagel 60

Pokretna faza: mravlja kiselina – acetone – kloroform (8,5 : 16,5 : 75)

Vizualizacija: nakon prskanja reagensima 1 i 2, u UV na 365 nm

K_k – otopina kavene kiseline (poredbena supstancija)

1 – metanolni ekstrakt listova

3 – etanolni ekstrakt listova (tinktura)



Slika 5. Kromatogram sastavnica listova i plodova sikavice

Nepokretna faza: Silikagel 60

Pokretna faza: mravlja kiselina – acetone – kloroform (8,5 : 16,5 : 75)

Vizualizacija: nakon prskanja reagensima 1 i 2, u UV na 365 nm

K_k – otopina kavene kiseline

1 – metanolni ekstrakt listova

4 – etanolni ekstrakt plodova (tinktura)

5 – etanolni ekstrakt plodova (tekući ekstrakt)

žutozelena koja odgovara silibininu, ostale zone zelenožute fluorescencije pripadaju sastavnicama silimarinskog kompleksa.

Budući da je naše istraživanje provedeno i s ciljem uporabe listova sika-vice u čajnim mješavinama, priređene su vodene iscrpine prema uputama za pripremu čajnog napitka. Ukoncentrirana vodena iscrpina listova trokratno je ekstrahirana etilacetatom, a etilacetatni ekstrakt potom analiziran na tankom sloju adsorbensa uz iste uvjete kromatografiranja. Nakon razvijanja i detekcije uočena je slična kromatografska slika, ali je drukčija boja fluorescencije zone u visini poredbene supstancije.

Pregledom dostupne literature nađen je citat Gaedcke (9) koja opisuje silimarin kao lipofilni kompleks, dakle netopiv u vodi. Zona zelenožute fluorescencije u visini zone kavene kiseline na našim kromatogramima vjerojatno pripada sastavnici flavonoidne strukture, možda apigeninskom ili kemferolskom glikozidu.

Ponovo ističemo da se u pučkoj medicini već stoljećima listovi sika-vice rabe u terapiji jetrenih oboljenja, ali i oboljenja slezene i žuči. Samo je po sebi jasno, da se radi o pripremi čajnih napitaka, dakle vodenih iscrpina. No, postavlja se pitanje, ako nema silimarinskog kompleksa, koje tvari listova sika-vice izazivaju povoljan terapijski učinak i kakav? Za sada se može samo pretpostaviti da bi te aktivne sastavnice mogli biti flavonoidni derivati apigenina, luteolina i kemferola dok se konačan odgovor jedino može dobiti daljnjim istraživanjem.

ZAKLJUČAK

Metodom kromatografije na tankom sloju silikogela istražene su sastavnice metanolnim i etanolnim ekstraktima uzoraka listova i plodova sika-vice iz uzgoja.

Na kromatogramu plodova dokazana je prisutnost jedne sastavnice silimarinskog kompleksa. U listovima, međutim, nije dokazana ista sastavnica, ali bi flavonoidne komponente koje pripadaju apigeninu i kemferolu mogle biti zanimljive za daljnja istraživanja, čime bi se opravdala tradicionalna uporaba čaja od listova sika-vice za ublažavanje jetrenih tegoba.

Također, bilo bi korisno provjeriti prisutnost silimarina na uzorcima samoniklih biljaka sa njihovog prirodnog staništa.

Literatura – References

1. J. Radić, Bilje Biokova, Institut »Planina i more«, Makarska 1976, 177.
2. Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis, Chemikalien und Drogen, VI Band B, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1979, 398.
3. H. Wagner, L. Hörhammer, R. Münster, *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* **18** (1968) 688–696.
4. R. Zalecki, St. Kordana, *Drogenreport* **6** (1993) 7–11.
5. I. Šilješ, B. Grozdanić, I. Grgesina, *Poznavanje, uzgoj i prerada ljekovitog bilja*, Školska knjiga i HAZU, Zagreb 1992, 31–33.
6. F. M. Hommouda, S. I. Ismail, N.M. Hassan, A.K. Zaki, A. Kamel, H. Rimpler, 39th. Annual Congress on Medicinal Plant Research, Saarbrücken, 3.–7. Sept. 1991
7. R. Hänsel, O. Sticher, E. Steinegger, *Pharmakognosie-Phytopharmazie*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1999, 866.

8. J. Barnes, L.A. Anderson, J.D. Phillipson, Herbal Medicines, Pharmaceutical Press, London, Chicago 2002, 341–348.
9. F. Gaedcke, Z. Phytother. **20** (1999) 254–263.
10. Ph. Jug. IV, Pharmacopoea Yugoslavica, Editio Quatra, Beograd, Savezni zavod za zdravstvenu zaštitu, 1984.

Primitljeno 27. III. 2003.