NGHIÊN CỨU ĐỊNH LƯỢNG SILYBIN TRONG HUYẾT TƯƠNG CHÓ BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO

Đặng Trường Giang[1], Hồ Bá Ngọc Minh[1], Nguyễn Hoàng Hiệp[1]
Vũ Bình Dương[1], Nguyễn Thị Thảo[2], Phạm Văn Hiển[1]*

Tóm tắt

Mục tiêu: Xây dựng và thẩm định phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (high-performance liquid chromatography - HPLC) để định lượng silybin (Si) trong huyết tương chó. ***Phương pháp nghiên cứu:*** Thiết lập điều kiện sắc ký trên cột Luna C18; pha động MeOH:H_3PO_4:nước (pha A: 20:0,5:80; pha B: 80:0,5:20) theo chương trình gradient; thể tích tiêm mẫu là 100µL. Mẫu huyết tương được chuẩn bị bằng cách kết tủa protein sử dụng methanol (MeOH) hoặc acid percloric. Catechin được sử dụng làm chất chuẩn nội. Thẩm định phương pháp theo hướng dẫn của FDA với các tiêu chí: Độ chọn lọc - đặc hiệu, tính tương thích hệ thống, khoảng tuyến tính, độ chính xác, độ đúng, giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ) và độ ổn định. ***Kết quả:*** Xác định được các điều kiện xử lý mẫu và các điều kiện sắc ký. Phương pháp đảm bảo độ chọn lọc - đặc hiệu, tuyến tính tốt trong khoảng nồng độ 0,118 - 11,758 µg/mL Si-A và 0,128 - 12,754 µg/mL Si-B, với R^2 = 0,9997. Phương pháp đảm bảo độ lặp lại với RSD ≤ 3,99%. Độ thu hồi của phương pháp trong khoảng 85 - 115%. LOD/LOQ: Si-A (4,69/14,20 ng/mL), Si-B (2,79/8,46 ng/mL). Si ổn định trong huyết tương sau 24 giờ (độ thu hồi là 98,30 - 114,43%) và sau 3 chu kỳ đông - rã (độ thu hồi là 85,34 - 111,65%). ***Kết luận:*** Xây dựng và thẩm định được phương pháp HPLC để xác định hàm lượng Si trong huyết tương chó.

Từ khóa: Silybin; Huyết tương chó; Sắc ký lỏng hiệu năng cao.

---

[1]Trung tâm Nghiên cứu, Ứng dụng và Sản xuất thuốc, Học viện Quân y

[2]Đơn nguyên Da liễu, Bệnh viện Đa khoa Hà Đông

[*]Tác giả liên hệ: Phạm Văn Hiển (phamvanhien181288@gmail.com)

Ngày nhận bài: 14/7/2025

Ngày được chấp nhận đăng: 23/10/2025

http://doi.org/10.56535/jmpm.v50i9.1441

QUANTITATIVE DETERMINATION OF SILYBIN IN CANINE PLASMA USING HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Abstract

Objectives: To develop and validate a high-performance liquid chromatography (HPLC) method for quantifying silybin (Si) in canine plasma. ***Methods:*** Chromatographic separation was carried out on a Luna C18 column using a gradient mobile phase of methanol:phosphoric acid:water (phase A, 20:0.5:80; phase B, 80:0.5:20). A 100µL injection volume was used. Plasma samples were prepared by precipitating proteins with methanol or perchloric acid. Catechin served as the internal standard. The method was validated according to FDA guidelines, assessing selectivity, specificity, system suitability, linearity, accuracy, precision, limits of detection (LOD) and quantification (LOQ), and sample stability. ***Results:*** Optimized sample preparation and chromatographic conditions were established. The method was selective and specific, with linear calibration ranges of 0.118 - 11.758 µg/mL for Si-A and 0.128 - 12.754 µg/mL for Si-B ($R^2 = 0.9997$). Relative standard deviations were not more than 3.99% and recoveries were between 85% and 115%. For Si-A, LOD and LOQ were 4.69 ng/mL and 14.20 ng/mL; for Si-B, they were 2.79 ng/mL and 8.46 ng/mL. Silybin concentrations remained stable after 24 hours (recoveries 98.30 - 114.43%) and after three freeze-thaw cycles (recoveries 85.34 - 111.65%). ***Conclusion:*** A HPLC method for the quantification of silybin in canine plasma was successfully developed and validated.

Keywords: Silybin; Canine plasma; High-performance liquid chromatography.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Silybin là một flavonoid được chiết xuất từ cây Kế sữa (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.) và là thành phần chủ yếu tạo nên các hoạt tính sinh học quan trọng như chống oxy hóa, bảo vệ tế bào gan khỏi tác động của các yếu tố như thuốc, đồ uống có cồn… [1]. Tuy nhiên, do khả năng hòa tan và tính thấm kém nên sinh khả dụng theo đường uống của Si là rất thấp [1, 2]. Do đó, nhiều nghiên cứu trên thế giới và trong nước đã phát triển các dạng bào chế nhằm mục đích nâng cao sinh khả dụng của hoạt chất này [3 - 5]. Để đánh giá được sinh khả dụng của các dạng bào chế chứa Si, cần có phương pháp định lượng Si trong huyết tương, vấn đề mà hiện nay trong nước chưa có nhiều nghiên cứu. Vì vậy, nghiên cứu này được tiến hành nhằm: *Xây dựng và thẩm định một quy trình định lượng Si trong huyết tương chó, phục vụ cho việc đánh giá sinh khả dụng của các dạng bào chế chứa Si.*

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu

Chuẩn Si (98,0%) (Sigma Aldrich, Mỹ), số lô: R01720; chuẩn catechin (97,0%), số lô F0H389 (Sigma Aldrich, Mỹ); huyết tương chó (do Ban Động vật, Học viện Quân y cung cấp), được bảo quản ở nhiệt độ -30°C ± 5°C; acid phosphoric 85% (Merck, Đức); methanol (Trung Quốc); methanol HPLC (Merck, Đức); acid percloric (Trung Quốc); nước cất. Hệ thống HPLC Waters e2695 Binary HPLC pump, Waters PDA2998 detector UV/Vis (Waters, Mỹ), cột Luna (250 x 4,6mm; 5µm) (Phenomenex, Mỹ); máy ly tâm Spectrafuge 16M (Labnet, Mỹ); máy lắc Vision VS-201P (Vision, Hàn Quốc) và một số hoá chất, thiết bị thường quy khác.

2. Phương pháp nghiên cứu

Xây dựng và thẩm định phương pháp HPLC để định lượng Si trong huyết tương chó với các nội dung sau:

* *Chuẩn bị mẫu:* Pha dung dịch chuẩn gốc Si và dung dịch chuẩn nội catechin trong MeOH để thu được các dung dịch có nồng độ tương ứng khoảng 1.000 µg/mL và 200 µg/mL. Từ dung dịch chuẩn gốc, chuẩn bị dãy nồng độ chuẩn Si từ 10 - 400 µg/mL.

* *Tiến hành:* Hút chính xác 50µL methanol hoặc dung dịch chuẩn Si, trộn với 500µL huyết tương và lắc đều trong 90 giây; bổ sung 50µL acid percloric 20%, lắc đều. Tiếp tục thêm 350µL methanol và 50µL dung dịch nội chuẩn catechin, trộn kỹ rồi ly tâm với tốc độ 12.000 vòng/phút trong 40 phút. Lấy phần dịch trong để phân tích, đồng thời tạo dãy mẫu chuẩn trong huyết tương từ 0,2 - 20 µg/mL.

* *Điều kiện sắc ký:* Cột sắc ký Luna C18 (250 × 4,6mm; 5 µm), nhiệt độ cột 40°C, detector PDA ở bước sóng 288nm. Pha động gồm: Pha A (MeOH/H_3PO_4/nước, tỷ lệ 20/0,5/80) và pha B (MeOH/H_3PO_4/nước, tỷ lệ 80/0,5/20). Tốc độ dòng 1,0 mL/phút, thể tích tiêm 100µL, chương trình gradient: 15% B từ 0 - 5 phút; 15 - 45% B từ 5 - 20 phút; 45% B từ 20 - 30 phút; giảm từ 45% B xuống 15% B trong 30 - 31 phút và giữ 15% B tới phút thứ 40.

* *Phương pháp xử lý mẫu huyết tương:* Khảo sát, đánh giá hai kỹ thuật xử lý mẫu [6]: (i) trộn 750µL MeOH với 50µL nội chuẩn catechin, thêm 500µL huyết tương, lắc đều và ly tâm với tốc độ 4.000 vòng/phút trong 15 phút ở 6°C, lấy dịch trong; (ii) trộn 500µL huyết tương với 50µL acid percloric 20%, lắc kỹ, thêm 350µL MeOH và 50µL nội chuẩn, lắc đều và ly tâm 12.000 vòng/phút trong 40 phút, lấy dịch trong. Cả hai phương pháp đều được tiến hành sắc ký trên mẫu trắng và mẫu thử, sau đó, căn cứ vào sắc ký đồ thu được để lựa chọn phương pháp phù hợp nhất.

* *Thẩm định phương pháp phân tích:* Phương pháp được thẩm định dựa trên các tiêu chí theo hướng dẫn của FDA,

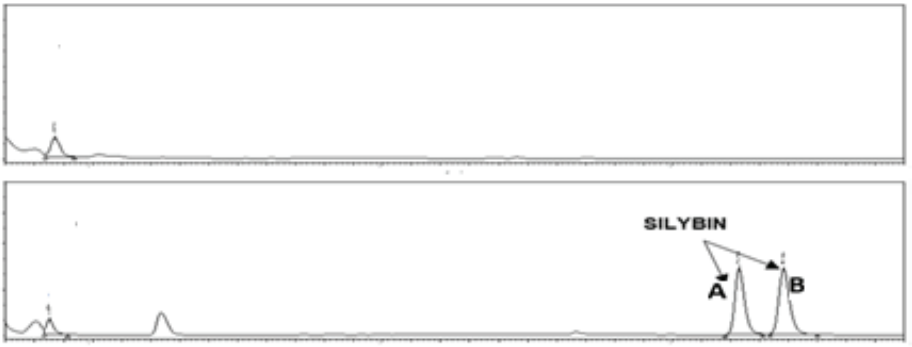
bao gồm [7]: Tính tương thích hệ thống, khoảng tuyến tính, độ chính xác, độ đúng, LOD, LOQ, độ ổn định của mẫu.

3. Đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện theo quy định của Trung tâm Nghiên cứu, Ứng dụng và Sản xuất thuốc, Học viện Quân y. Số liệu nghiên cứu được Trung tâm Nghiên cứu, Ứng dụng và Sản xuất thuốc, Học viện Quân y cho phép sử dụng và công bố. Nhóm tác giả cam kết không có xung đột lợi ích trong nghiên cứu.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

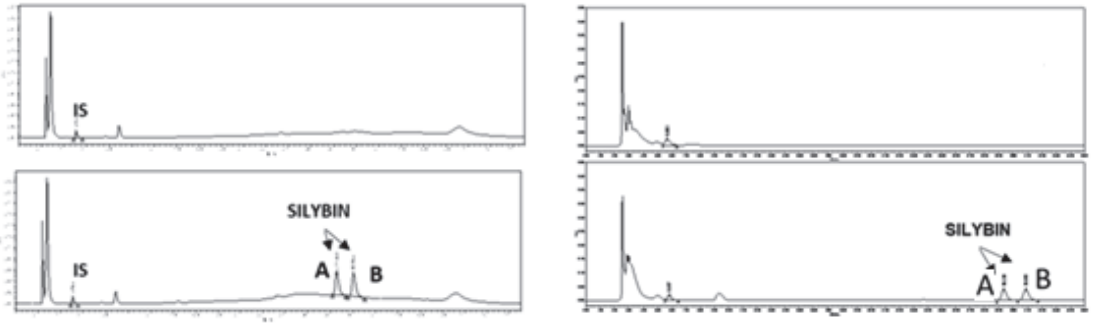
1. Kết quả khảo sát độ chọn lọc - đặc hiệu



Hình 1. Sắc ký đồ mẫu huyết tương trắng và Si trong huyết tương.

Kết quả cho thấy: Ở thời gian lưu của peak Si-A và Si-B, mẫu trắng không có tín hiệu. Các peak Si-A và Si-B trong mẫu thử đối xứng, sắc nét và tách biệt khỏi đỉnh tạp, chứng tỏ phương pháp có tính chọn lọc và đặc hiệu cao.

2. Kết quả khảo sát phương pháp xử lý mẫu



(PP1) **(PP2)**

Hình 2. Sắc ký đồ mẫu huyết tương trắng và mẫu Si trong huyết tương của hai phương pháp xử lý mẫu.

Kết quả cho thấy dịch chiết từ phương pháp 1 bị vẩn đục sau thời gian ngắn, trong khi phương pháp 2 có quy trình đơn giản nhưng vẫn cho khả năng thu hồi tốt Si. Do đó, phương pháp 2 được chọn cho các thử nghiệm đánh giá sinh khả dụng của phytosome Si.

3. Tính tương thích hệ thống

Tính tương thích hệ thống được đánh giá bằng cách sắc ký 5 lần liên tiếp hỗn hợp Si-A/Si-B trong huyết tương theo các điều kiện đã thiết lập. Kết quả được trình bày ở bảng 1.

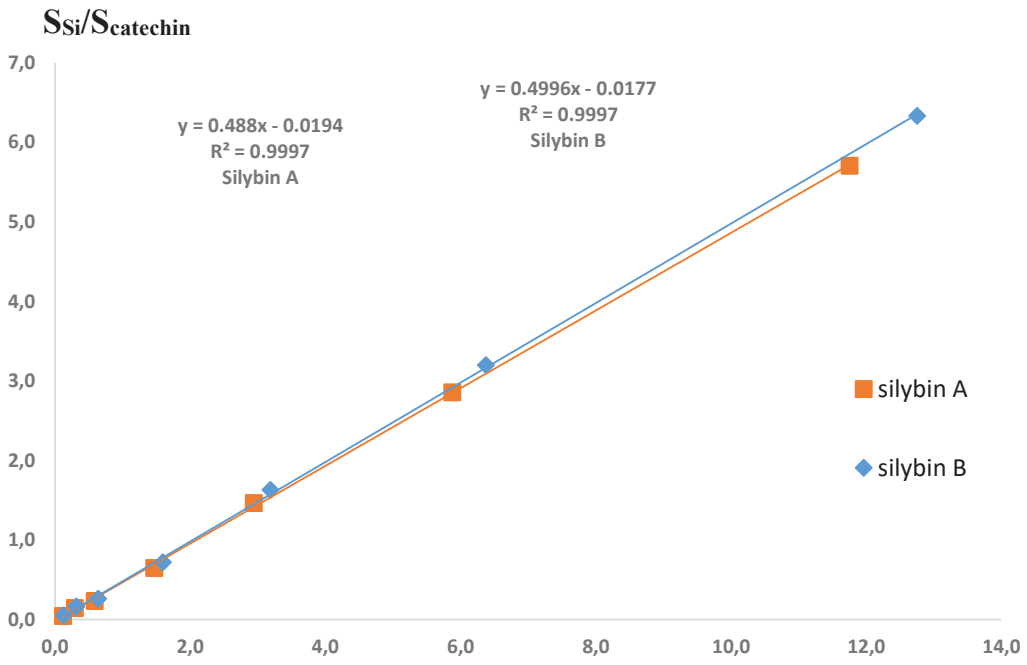
Bảng 1. Kết quả đánh giá tính tương thích hệ thống.

STT	T_R (phút)			S_{peak} (µAU.s)			Hệ số bất đối			Số đĩa lý thuyết (n)		
	CTC	Si-A	Si-B	CTC	Si-A	Si-B	CTC	Si-A	Si-B	CTC	Si-A	Si-B
1	5,716	29,363	30,921	355484	52482	58997	1,32	1,26	1,28	3764	3678	3366
2	5,671	29,378	30,913	358854	52995	58719	1,34	1,26	1,25	3756	3679	3375
3	5,679	29,386	30,916	357707	52023	58102	1,34	1,27	1,26	3761	3682	3368
4	5,675	29,367	30,893	356878	52857	56410	1,31	1,25	1,23	3764	3681	3369
5	5,680	29,343	30,894	356796	51864	56999	1,30	1,23	1,22	3767	3688	3360
$\bar{X}$	5,685	29,374	30,911	357144	52444	57845	1,322	1,25	1,25	3762	3681	3367
SD	0,02	0,01	0,01	1244	497	1110	0,02	0,015	0,02	4,16	3,91	5,41
RSD%	0,36	0,04	0,04	0,35	0,95	1,92	1,51	1,20	1,60	0,11	0,11	0,16

(CTC: Catechin)

Kết quả cho thấy thời gian lưu trung bình của catechin, Si-A và Si-B lần lượt khoảng 5,685 ± 0,02 phút; 29,374 ± 0,01 phút và 30,911 ± 0,01 phút với RSD ≤ 0,36%. Diện tích peak tại nồng độ khảo sát, hệ số bất đối và số đĩa lý thuyết đối với 3 chất có RSD dao động lần lượt từ 0,35 - 1,92% (diện tích peak), 1,20 - 1,60% (hệ số bất đối), 0,11 - 0,16% (số đĩa lý thuyết). Hệ số bất đối nằm trong khoảng 0,8 - 2,0, số đĩa lý thuyết nằm trong khoảng 2.500 - 5.500 và RSD của tất cả các thông số đều ở mức < 2%, chứng tỏ hệ phương pháp phân tích này là tương thích với hệ thống sắc ký.

4. Khoảng nồng độ tuyến tính



Hình 3. Đồ thị mô tả mối quan hệ tuyến tính của diện tích peak và nồng độ các chất phân tích trong khoảng khảo sát.

Phân tích dãy chuẩn Si-A (0,118 - 11,758 µg/mL) và Si-B (0,128 - 12,754 µg/mL) cho thấy tỷ lệ diện tích peak ($S_{Si}/S_{catechin}$) tăng tuyến tính theo khoảng nồng độ. Phương trình hồi quy thu được có dạng y = 0,488x - 0,0194 đối với Si-A và y = 0,4996x - 0,0177 đối với Si-B, với hệ số tương quan R^2 gần 1. Như vậy, phương pháp định lượng đồng thời Si-A và Si-B đáp ứng yêu cầu về độ tuyến tính.

5. Độ chính xác

Để kiểm tra độ lặp lại của phương pháp, các mẫu kiểm soát nồng độ thấp, trung bình và cao (LQC, MQC và HQC) của Si-A và Si-B (nồng độ lần lượt là 0,294 và 0,319 µg/mL; 2,940 và 3,189 µg/mL; 11,758 và 12,754 µg/mL) được chuẩn bị (mỗi mức nồng độ chuẩn bị 3 mẫu), sau đó tiến hành phân tích trong cùng ngày cũng như ở hai ngày khác nhau. Kết quả thể hiện ở bảng 2 và 3.

Bảng 2. Kết quả đánh giá độ chính xác trong ngày và khác ngày của Si-A.

Nồng độ mẫu phân tích		Ngày 1	Ngày 2
LQC (0,294 µg/mL)	Giá trị thống kê theo từng ngày	0,340 ± 0,003 (RSD = 0,95%)	0,317 ± 0,007 (RSD = 2,17%)
	Giá trị thống kê cả 2 ngày	0,328 ± 0,013 (RSD = 3,99%)	
MQC (2,940 µg/mL)	Giá trị thống kê theo từng ngày	3,114 ± 0,058 (RSD = 1,86%)	3,232 ± 0,016 (RSD = 0,48%)
	Giá trị thống kê cả 2 ngày	3,173 ± 0,075 (RSD = 2,36%)	
HQC (11,758 µg/mL)	Giá trị thống kê theo từng ngày	11,957 ± 0,281 (RSD = 2,35%)	12,736 ± 0,057 (RSD = 0,45%)
	Giá trị thống kê cả 2 ngày	12,346 ± 0,464 (RSD = 3,76%)	

Bảng 3. Kết quả đánh giá độ chính xác trong ngày và khác ngày của Si-B.

Nồng độ mẫu phân tích		Ngày 1	Ngày 2
LQC (0,319 µg/mL)	Giá trị thống kê theo từng ngày	0,327 ± 0,00 (RSD = 1,59%)	0,335 ± 0,009 (RSD = 2,54%)
	Giá trị thống kê cả 2 ngày	0,331 ± 0,008 (RSD = 2,34%)	
MQC (3,189 µg/mL)	Giá trị thống kê theo từng ngày	3,367 ± 0,073 (RSD = 2,17%)	3,500 ± 0,043 (RSD = 1,24%)
	Giá trị thống kê cả 2 ngày	3,433 ± 0,091 (RSD = 2,64%)	
HQC (12,754 µg/mL)	Giá trị thống kê theo từng ngày	12,955 ± 0,302 (RSD = 2,33%)	13,816 ± 0,073 (RSD = 0,53%)
	Giá trị thống kê cả 2 ngày	13,385 ± 0,511 (RSD = 3,81%)	

Kết quả cho thấy, RSD ở các điểm khảo sát trong ngày và khác ngày đều < 3%. Như vậy, phương pháp định lượng đảm bảo độ lặp lại.

6. Độ đúng

Sử dụng mẫu huyết tương chứa Si (nồng độ khoảng 1,5 µg/mL) và thêm vào từng lượng chuẩn tương ứng ba mức LQC, MQC và HQC. Phân tích sắc ký theo các điều kiện đã lựa chọn. Tính toán lượng Si thu hồi dựa vào đường chuẩn và so sánh với lượng chất chuẩn thực tế thêm vào. Kết quả thể hiện ở bảng 4.

Bảng 4. Kết quả đánh giá độ đúng đối với Si-A/B.

Độ thu hồi	Lượng thêm vào*		
	LQC	MQC	HQC
Si-A ($\overline{X}$ ± SD, %)	89,15 ± 1,26 (RSD = 1,41%)	114,60 ± 2,76 (RSD = 2,41%)	111,11 ± 1,56 (RSD = 1,40%)
Si-B ($\overline{X}$ ± SD, %)	90,17 ± 2,34 (RSD = 2,60%)	114,68 ± 2,56 (RSD = 2,23%)	110,96 ± 1,81 (RSD = 1,63%)

(: Là lượng chuẩn thêm vào LQC, MQC, HQC trên mẫu thử đối với các chuẩn Si-A lần lượt là 0,15; 1,13; 4,75µg; đối với Si-B lần lượt là 0,16; 1,23; 5,15µg)*

Kết quả cho thấy, ở 3 điểm khảo sát, độ thu hồi của phương pháp đều trong khoảng 85 - 115%. Do vậy, phương pháp định lượng đáp ứng yêu cầu về độ đúng.

7. Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng

LOD và LOQ được xác định bằng cách phân tích ba mẫu trắng, đo nhiễu nền tại thời gian lưu của Si và tính toán theo công thức k × SD/δ (k = 3,3 đối với LOD và k = 10 đối với LOQ), với SD là độ lệch chuẩn của tín hiệu nền và δ là hệ số dốc của đường chuẩn. Kết quả cho thấy giá trị LOD và LOQ của Si-A lần lượt là 4,69 ng/mL và 14,20 ng/mL; đối với Si-B là 2,79 ng/mL và 8,46 ng/mL.

8. Độ ổn định của mẫu

** Độ ổn định của mẫu trong ngày:*

Độ ổn định trong ngày được đánh giá bằng việc định lượng Si ở các mức LQC, MQC và HQC sau khi mẫu được bảo quản 24 giờ. Kết quả được thể hiện ở bảng 5.

Bảng 5. Kết quả đánh giá độ ổn định trong ngày.

Mẫu	LQC**		MQC**		HQC**	
	Si-A	Si-B	Si-A	Si-B	Si-A	Si-B
Fresh ($\overline{X} \pm SD$)	111,58 ± 0,93	110,42 ± 3,54	105,32 ± 0,66	105,44 ± 1,51	98,70 ± 0,98	98,79 ± 0,96
Mẫu sau 9 giờ ($\overline{X} \pm SD$)	114,89 ± 1,72	111,60 ± 0,50	104,17 ± 2,85	104,67 ± 3,07	98,82 ± 1,76	99,10 ± 1,93
Mẫu sau 24 giờ ($\overline{X} \pm SD$)	114,43 ± 1,91	112,80 ± 2,58	108,91 ± 1,24	108,95 ± 1,83	98,30 ± 2,30	98,79 ± 0,96

*(** Các nồng độ LQC, MQC, HQC đối với Si-A lần lượt là 0,294; 2,940; 11,758 µg/mL; đối với Si-B lần lượt là 0,319; 3,189; 12,754 µg/mL)*

Kết quả cho thấy tỷ lệ thu hồi dao động từ 110,42 - 114,43% đối với mẫu LQC, 104,17 - 108,95% đối với mẫu MQC và 98,30 - 99,10% đối với mẫu HQC. Điều này cho thấy Si ổn định trong huyết tương trong 24 giờ.

** Độ ổn định của mẫu sau các chu kỳ rã đông:*

Độ ổn định của mẫu được đánh giá bằng cách phân tích các mẫu LQC, MQC và HQC sau 3 chu kỳ rã đông. Kết quả được thể hiện ở bảng 6.

Bảng 6. Kết quả đánh giá độ ổn định sau các chu kỳ rã đông.

Mẫu	LQC**		MQC**		HQC**	
	Si-A	Si-B	Si-A	Si-B	Si-A	Si-B
Fresh ($\overline{X} \pm SD$)	111,58 ± 0,93	110,42 ± 3,54	105,32 ± 0,66	105,44 ± 1,51	98,70 ± 0,98	98,79 ± 0,96
1 chu kỳ rã đông ($\overline{X} \pm SD$)	100,76 ± 4,73	99,64 ± 3,60	100,96 ± 1,71	101,00 ± 1,85	103,21 ± 0,87	103,04 ± 0,91
2 chu kỳ rã đông ($\overline{X} \pm SD$)	106,34 ± 4,29	101,94 ± 0,94	106,37 ± 1,59	106,06 ± 1,37	95,91 ± 3,36	94,04 ± 0,09
3 chu kỳ rã đông ($\overline{X} \pm SD$)	111,65 ± 2,01	108,86 ± 1,64	85,34 ± 2,18	85,64 ± 2,26	89,77 ± 1,58	89,67 ± 1,85

*(** Các nồng độ LQC, MQC, HQC đối với Si-A lần lượt là 0,294; 2,940; 11,758 µg/mL; đối với Si-B lần lượt là 0,319; 3,189; 12,754 µg/mL)*

Kết quả cho thấy độ thu hồi trong khoảng 99,64 - 111,65% đối với mẫu LQC, 85,34 - 105,44% đối với MQC và 89,67 - 103,21% đối với mẫu HQC. Như vậy, Si ổn định trong huyết tương sau 3 chu kỳ rã đông.

KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xác định được các điều kiện sắc ký thích hợp để định lượng Si trong huyết tương chó. Phương pháp xử lý mẫu sử dụng catechin làm chất nội chuẩn và phương pháp kết tủa protein, chiết xuất hoạt chất trong huyết tương bằng methanol, sau đó, Si được định lượng bằng phương pháp HPLC. Phương pháp đã xây dựng được quy trình thẩm định đáp ứng các tiêu chí theo hướng dẫn của FDA, có thể được áp dụng trong các nghiên cứu đánh giá sinh khả dụng của những dạng bào chế khác nhau của Si.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bijak M. Si, a major bioactive component of milk thistle (Silybum marianum L. Gaernt.) - chemistry, bioavailability, and metabolism. *Molecules*. 2017; 22(11).

2. Pérez-Sánchez A, Cuyàs E, Ruiz-Torres V, et al. Intestinal permeability study of clinically relevant formulations of silibinin in Caco-2 cell monolayers. *Int J Mol Sci*. 2019; 20(7).

3. Chi C, Zhang C, Liu Y, et al. Phytosome-nanosuspensions for Si-phospholipid complex with increased bioavailability and hepatoprotection efficacy. *Eur J Pharm Sci*. 2020; 144: 105212.

4. Filburn CR, Kettenacker R, Griffin DW. Bioavailability of a Si-phosphatidylcholine complex in dogs. *J Vet Pharmacol Ther*. 2007; 30(2): 132-138.

5. Marhol P, Bednář P, Kolářová P, et al. Pharmacokinetics of pure Si diastereoisomers and identification of their metabolites in rat plasma. 2015; 14:570-580.

6. FDA. Guidance for industry: Bioanalytical method validation, Services U.S.D.o.H.a.H., Administration F.a.D., USA. 2018.

7. Méndez-Sánchez N, Dibildox-Martinez M, Sosa-Noguera J, et al. Superior Si-Bioavailability of Si-phosphatidylcholine complex in oily-medium soft-gel capsules versus conventional silymarin tablets in healthy volunteers. *BMC Pharmacol Toxicol*. 2019; 20(1):5.