

水飞蓟宾与脂多糖同时加入巨噬细胞孵育,结果显示,水飞蓟宾剂量依赖地抑制脂多糖诱导巨噬细胞TGF β 的产生(表2)。

表2 水飞蓟宾对脂多糖诱导巨噬细胞产生TGF β 的影响

水飞蓟宾($\mu\text{g/ml}$)	转化生长因子活性(cpm)
对照组	1 506 \pm 332
6.25	1 580 \pm 237
12.5	1 694 \pm 216 ¹⁾
25.0	2 165 \pm 243 ²⁾
50.0	2 787 \pm 168 ²⁾

$n=6$, $\bar{x} \pm s$, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ vs control.

3 讨论

肝脏实质细胞和非实质细胞均参与了肝纤维化的形成^[6]。目前比较公认的观点是,肝星状细胞是肝纤维化发生的关键。此外,肝脏的巨噬细胞即库普弗细胞在肝纤维化发生发展过程中也起着重要作用。肝实质受到各种致病因素损伤时,库普弗细胞激活并释放细胞因子如成和释放的细胞因子如转化生长因子 β_1 、血小板源生长因子、肿瘤坏死因子、白细胞介素-1、6等,激活肝星状细胞,促进星状细胞增殖和产生胶原,使细胞外基质过度沉积。故肝星状细胞和巨噬细胞均是研究抗肝纤维化药物的靶标。前期我们研究发现,水飞蓟宾能显著抑制肝星状细胞HSC-T6细胞增殖和胶原合成^[7],本文我们研究其对巨噬细胞产生促胶原合成因子和转化生长因子 β 的影响。

实验结果显示,水飞蓟宾显著抑制巨噬细胞释放促胶原合成因子,进一步研究发现抑制巨噬细胞产生TGF β 与抑制促胶原合成因子平行,说明水飞蓟宾主要是通过抑制TGF β 起作用。在实验性肝纤维化模型和肝纤维化患者均有高水平的TGF β 表达,此外,TGF β_1 在体外直接促进肝星状细胞合成胶

原,也能抑制肝星状细胞胶原酶表达及促进基质金属蛋白酶抑制剂的产生,从而抑制细胞外基质的降解,还能促进肝星状细胞表达血小板源生长因子及其受体,促进肝星状细胞增殖,因此TGF β (主要是TGF β_1)是迄今为止公认的最强促肝纤维化因子^[8,9]。因此,水飞蓟宾减少巨噬细胞释放TGF β 可能是其保肝抗硬化机制之一。

参考文献:

- [1] Gressner AM, Bachem MG. Cellular communications and cell matrix interactions in the pathogenesis of fibroproliferative diseases: liver fibrosis as a paradigm [J]. *Ann Biol Clin*, 1994, 52: 205.
- [2] Peterson TC, Isbrucker RA. Fibroproliferation in liver disease: role of monocyte factors [J]. *Hepatology*, 1992, 15: 191.
- [3] Flora K, Hahn M, Rosen H, et al. Milk thistle (Silybum Marianum) for the therapy of liver disease [J]. *Am J Gastroenterol*, 1998, 93(2): 139.
- [4] Friedman SL, Lalazar A, Wong L, et al. HSC-T6 cells, an immortalized rat hepatic stellate cell line [J]. *Hepatology*, 1997, 27(5): 338A.
- [5] Zhang JP, Zhang M, Jin C, et al. Matrine inhibits production and actions of fibrogenic cytokines released by mouse peritoneal macrophages [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2001, 22(8): 765.
- [6] 李晓玉,李俊. 免疫药理学新论[M]. 北京:人民卫生出版社, 2004: 200~228.
- [7] 张 旻,张俊平,王杰松,等. 水飞蓟宾对大鼠肝贮脂细胞HSC-T6增殖和胶原合成的影响[J]. 第二军医大学学报, 2000, 21(10): 932.
- [8] Tsukamoto H. Cytokine regulation of hepatic stellate cells in liver fibrosis [J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 1999, 23: 911.
- [9] Tiggelman AM, Boers W, Lanthorst C, et al. Collagen synthesis by human liver (myo)fibroblasts in culture: evidence for a regulatory role of IL-1 beta, IL-4, TGF beta and IFN gamma [J]. *J Hepatology*, 1995, 23: 307.

收稿日期: 2005-09-05

一阶导数分光光度法测定水飞蓟宾脂质体的包封率

张 良, 赵益华(中国人民解放军第515医院药局, 江苏 江阴 214431)

摘要 目的: 建立一种测定水飞蓟宾脂质体包封率的方法。**方法:** 采用一阶导数分光光度法, 中间波长为275nm和317nm, 测定波长分别为274、276、316、318nm。**结果:** 在0~30.3 $\mu\text{g/ml}$ 时 δ 与水飞蓟宾浓度呈良好的线性关系, $r=0.9995$, 样品的回收率100.8%, $RSD=0.8\%$ ($n=9$)。**结论:** 以一阶导数分光光度法测定水飞蓟宾脂质体的包封率切实可行。

关键词 一阶导数分光光度法; 水飞蓟宾脂质体; 包封率

作者简介: 张良(1979-), 男, 药师. Tel: (0510) 2921023, E-mail: jy-zl131@tom.com.

中图分类号:R927

文献标识码:A

文章编号:1006-0111(2006)01-0022-04

Determination of the entrapment efficiency of silybin liposomes by first derivative spectrometry

ZHANG Liang, ZHAO Yi-hua (Department of Pharmacy, No. 515 Hospital of PLA, Jiangyin 214431, China)

ABSTRACT Objective: To establish a method for the determination of the entrapment efficiency of silybin liposomes. **Methods:** First derivative spectrometry was established. The two middle wavelengths were 275nm and 317nm. The detection wavelengths were 274, 276, 316 and 318nm, respectively. **Results:** The calibration curve of silybin was linear in the range of 0~30.3 μ g/mL and the correlation coefficient was 0.9995. The average recovery and relative standard deviation were 100.8% and 0.8%, respectively. **Conclusion:** The method is practicable.

KEY WORDS first derivative spectrometry; silybin liposomes; entrapment rate

脂质体(liposome)是一种新型定向药物载体,具有良好的靶向性和生物相容性,并能改变被包封药物的体内分布,从而提高药物的治疗指数,减少药物的治疗剂量和降低药物的毒性^[1],在许多疾病的治疗中显示了明显的优越性。包封率是脂质体的重要质控指标。水飞蓟宾(silybin, SLB)是临床常用的抗肝脏疾病的药物,它是二氢黄酮类化合物,属于水飞蓟素的成分之一^[2]。本实验以水飞蓟宾脂质体为模型,在用葡聚糖凝胶将游离SLB和SLB脂质体分离后采用一阶导数分光光度法测定包封率,取得了满意的结果,现报告如下。

1 仪器与药品

752紫外光栅分光光度计(上海精密科学仪器有限公司);层析柱(天津玻璃仪器厂);TG328B分析天平(上海天平仪器厂);水飞蓟宾(镇江第三制药厂惠赠);水飞蓟宾脂质体(自制);豆磷脂(上海黄浦江磷脂公司);Sephadex G-100(上海化学试剂厂);甲醇和氯仿均为分析纯。

2 处方与工艺

2.1 处方 水飞蓟宾 0.2g, 豆磷脂 1.0g, 甲醇 10mL, 氯仿 10 mL, 生理盐水适量。

2.2 制备工艺 取水飞蓟宾原料 0.2g, 加入甲醇 10 mL, 氯仿 10 mL, 充分溶解后加入旋转蒸发仪中进行负压旋转蒸发^[3], 待完全形成透明薄膜后加入生理盐水适量振荡溶解, 用高压乳匀机匀化后即得。

3 方法与结果

3.1 零阶导数光谱的绘制 精密称取一定量的水飞蓟宾对照品, 用甲醇溶解定容, 制成 40 μ g/mL 溶液, 以甲醇为空白, 置 1cm 石英比色皿中, 于 250~330nm 范围内以 2nm 为间隔, 记录零阶光谱。

另按豆磷脂 1.0g, 甲醇 10 mL, 氯仿 10 mL 的比例, 按照“2.2”操作制作空白脂质体。将制备好的空白脂质体 1.0 mL 置 10mL 容量瓶中, 甲醇摇匀定容(供试液 1), 从供试液 1 中吸取 1.0 mL 置另一 10 mL 容量瓶中甲醇定容(供试液 2)。将供试液 2 于 250~330 nm 范围内以甲醇为空白, 以 2nm 为间隔, 记录零阶光谱。

3.2 一阶导数光谱的绘制 由“3.1”零阶光谱的数据绘制一阶导数光谱, $\Delta\lambda = 2\text{nm}$, 即以 2nm 为间隔, ΔA 为相邻波长吸光度之差, 以相邻波长的中间波长 λ_m 为横坐标, 以 $\Delta A/\Delta\lambda$ 的值为纵坐标, 作图的一阶导数光谱。

3.3 SLB 一阶导数工作曲线的绘制

3.3.1 SLB 对照品贮备液的制备 精密称取水飞蓟宾对照品适量, 置于 50mL 容量瓶中, 甲醇溶解, 定容。

3.3.2 磷脂贮备液的制备 取 3.1 制备好的空白脂质体 1.0 mL 于 10mL 容量瓶中, 生理盐水定容, 摇匀, 即得。

3.3.3 参比液的制备 取 1.0 mL 的生理盐水, 用甲醇定容至 10mL。

分别量取 SLB 对照品贮备液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.5mL 置 10mL 容量瓶中, 再在每容量瓶中加入 1.0 mL 磷脂贮备液, 依次用甲醇定容。以参比液为空白, 测定 274、276、316、318nm 波长处的吸光度。计算 $\delta = \Delta A_{275} - \Delta A_{317} = (A_{276} - A_{274}) - (A_{318} - A_{316})$ 并绘制 $\delta - C$ 的工作曲线, 计算出回归方程。

3.4 回收率试验 准确配制高、中、低 3 种浓度的 SLB 溶液。分别精密量取 1.0mL, 置 10 mL 容量瓶中, 同时加入 3.1 制备好的空白脂质体 1.0mL, 用甲醇定容, 摇匀, 以 1.0mL 生理盐水加甲醇定容至 10mL 的混合溶液为空白, 分别在 274、276、316、

318nm 处测定吸光度,计算 δ 值,按回归方程计算浓度,求得回收率。

3.5 稳定性试验 取回收率项下模拟溶液,室温放置 0、4、8、12、24h 后按回收率项下方法在 274、276、316、318nm 处测定吸光度,计算 δ 值。

3.6 凝胶柱分离试验 取充分容胀的 Sephadex G-100 适量,制备凝胶柱(200mm \times ϕ 15mm),精密量取脂质体混悬液 0.5mL 上柱,以生理盐水洗脱,流速 1.1mL/min,每管 1mL,收集 90 管。各管收集完毕,加甲醇摇匀定容至 5mL,以 1.0mL 生理盐水加甲醇定容至 5mL 的混合溶液为空白,于 288nm 处测定吸光度(注:288nm 是 SLB 的最大吸收波长)。绘制洗脱曲线。

3.7 样品的制备

3.7.1 测定被包封的 SLB 的样品液 精取脂质体混悬液 1.0mL 上柱,以生理盐水洗脱,乳白色带接近柱口时开始收集,待其完全通过时停止收集,收集到的 SLB 脂质体以生理盐水定容至 10mL,再精取稀释液 1.0mL 置于 10mL 容量瓶中,用甲醇定容,摇匀,即得。

3.7.2 测定 SLB 总量的样品液 精取脂质体混悬液 1.0mL,以生理盐水定容至 10mL,摇匀。再精取稀释液 1.0mL 置于 10mL 容量瓶中,用甲醇定容,摇匀,即得。

3.8 样品测定 以 1.0mL 生理盐水加甲醇定容至 10mL 的混合溶液为空白,分别在 274、276、316、318nm 处测定吸光度,计算 δ 值,按回归方程计算被包封的 SLB 浓度 C_1 和 SLB 总浓度 C_2 ,按 $C_1/C_2 \times 100\%$ 计算包封率。

4 结果

4.1 零阶导数光谱的绘制 根据 3.1 所得数据绘制零阶导数光谱,见图 1。

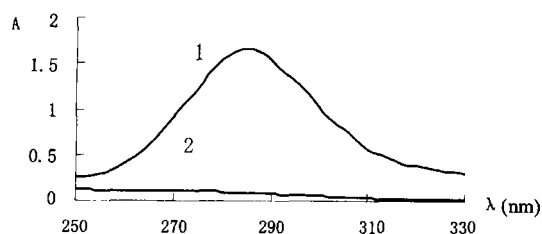


图 1 零阶导数光谱

1 - 水飞蓟宾; 2 - 空白脂质体

从图中可以看出,在 250 ~ 330 nm 范围内 SLB 近似为二次曲线,空白脂质体在此区间近似为一条直线,所以可用一阶导数消除辅料的干扰。

4.2 一阶导数光谱的绘制 根据 3.2 所得数据绘制一阶导数光谱,见图 2。

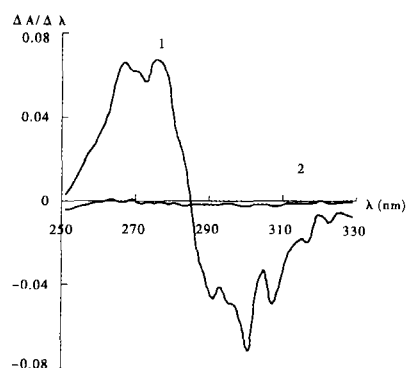


图 2 一阶导数光谱

1 - 水飞蓟宾; 2 - 空白脂质体

从 $\Delta A/\Delta \lambda \sim \lambda_m$ 的图中,选择中间波长 $\lambda_{m1} = 275\text{nm}$, $\lambda_{m2} = 317\text{nm}$ 。因为辅料(即干扰物)在这两中间波长处的导数值相等,而待测组分(SLB)在这两中间波长处的导数值有显著性差异,即在这两中间波长处测得的混合物的导数之差就是待测物在这两波长处的导数值之差,与待测物浓度成正比,而与干扰物无关。

在实际测定中,选择 274、276、316、318nm 4 个测定波长,测得这 4 个波长的吸收度,按 $\delta = \Delta A_{275} - \Delta A_{317} = (A_{276} - A_{274}) - (A_{318} - A_{316})$ 计算,将 δ 值作为待测组分的定量信息。

4.3 一阶导数工作曲线的绘制 根据 3.3 中的 δ 和 C 值绘制 $\delta - C$ 工作曲线,得回归方程 $\delta = 0.0033C + 0.0005$, $r = 0.9995$ ($n = 8$)。结果表明:在 0 ~ 30.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内 δ 与 C 呈良好的线性关系。

4.4 回收率试验 根据 3.4 的方法测得 SLB 的平均回收率为 100.8%,RSD 为 0.8%,结果见表 1。

表 1 水飞蓟宾的回收率试验结果

编号	投入量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	测得量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
1	28.2	28.3	100.4		
2	28.2	28.6	101.4		
3	28.2	28.0	99.3		
4	19.8	19.9	100.5		
5	19.8	20.2	102.0	100.8	0.8
6	19.8	19.9	100.5		
7	12.5	12.6	100.8		
8	12.5	12.6	100.8		
9	12.5	12.6	100.8		

4.5 稳定性试验 稳定性试验结果见表 2,结果表明:在 24h 内 δ 值无太大变化。

表 2 水飞蓟宾稳定性试验结果

C(μg/mL)	0h	4h	8h	12h	24h	RSD(%)
28.2	0.093	0.093	0.094	0.095	0.094	0.89
19.8	0.066	0.066	0.067	0.067	0.067	0.82
12.5	0.042	0.042	0.043	0.043	0.043	1.0

4.6 凝胶柱分离试验 由 3.6 结果绘制洗脱曲线, 在洗脱曲线上只见一明显的脂质体峰, 见图 3。

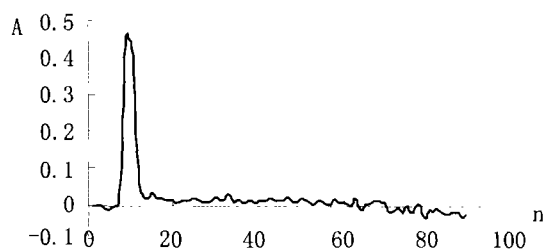


图 3 水飞蓟宾脂质体的洗脱曲线

4.7 样品的测定 根据 3.7 和 3.8 的方法, 共测 3 批水飞蓟宾脂质体混悬液, 其包封率分别为 82.2%, 81.4%, 80.8%。

5 讨论

5.1 本法在干扰组分单一的情况下可以有效的消除干扰吸收, 操作简单, 无需精密仪器, 结果准确。

5.2 利用葡聚糖凝胶过滤法将游离 SLB 和 SLB 脂质体分离, 此步为测定包封率的关键。在实验过程中我们发现, 用生理盐水长时间地洗脱 Sephadex G-100 凝胶柱, 在洗脱曲线上仅明显的有一个峰, 结合脂质体的颜色, 此峰必为脂质体峰。另外我们直接用游离药物走柱, 没有收集到游离药物, 证明了游

离药物不能通过凝胶柱的论断。原因可能是由于 SLB 为脂溶性, 不溶于生理盐水, 在生理盐水或走柱过程中析出结晶而导致其不能通过凝胶柱。虽然收集不到游离药物, 但我们通过测定过柱前后脂质体混悬液中的药物浓度, 依然可以达到测定包封率的目的。

5.3 从 UV 光谱看, 辅料在水飞蓟宾最大吸收 288nm 处干扰较小, 我们曾试图在 288nm 处直接测定, 但所得工作曲线的相关系数较差而未采用。

5.4 在实验过程中我们曾经直接采用 275nm 作为中间波长, 测定 274、276nm 处的吸光度, 按 $\delta = A_{276} - A_{274}$ 计算, 发现此 δ 也与浓度 C 呈良好的线性关系, 但终因回收率不及本实验所选方法而未采用。

5.5 在实际工作中, 由于仪器的性能与精度所限, 测定中波长、吸收等数值都有一定的变动范围, 而这些数值的变动引起导数光谱的变异相当灵敏; 同时还由于求导的条件不同, 例如 $\Delta\lambda$ 的值不同, 使导函数的值变异, 所以对于不同的仪器, 需重新绘制工作曲线^[4]。

参考文献:

- [1] 陆彬. 药物新剂型与新技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998:108.
- [2] 马波, 胡建平. 水飞蓟宾的研究进展[J]. 基层中药杂志, 1998, 12(3):48.
- [3] 平其能. 现代药剂学[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1998: 598.
- [4] 朱雅艳, 华俊彦. 一阶导数分光光度法测定胃炎合剂中盐酸普鲁卡因的含量[J]. 天津药学, 1999, 11(4):49.

收稿日期: 2005-03-17

高效液相色谱-蒸发光散射法测定白消安片的含量

岳昌林¹, 郭忠² (1. 浙江九旭药业有限公司, 浙江金华 321016; 2. 浙江九康药业有限公司, 浙江浦江 322200)

摘要 目的: 建立 HPLC-ELSD 法考察并测定白消安片中白消安的含量。方法: SHIMADZU C₈ 柱(250mm × 4.6mm, 5μm), 流动相: 水: 乙腈(75:25), 流速: 1.0mL/min, 载气: 氮气, 载气流速: 2.0bar。结果: 白消安在浓度 0.25~0.75mg/mL 范围内与峰面积的对数呈良好的线性关系, r 为 0.9999。平均回收率为 99.7%。结论: 本方法专属性好, 准确, 可用于该制剂中白消安含量的测定。

关键词 白消安; HPLC-ELSD; 含量测定

中图分类号: R927.2

文献标识码: A

文章编号: 1006-0111(2006)01-0025-03

Quantitative determination of content in Busulfan's tablets by HPLC-ELSD

作者简介: 岳昌林(1973-), 男, 副总经理. Tel: (0579)2261518,

E-mail: yuecanglin@163.com.