

Effect of JinSanE on expression of TGF β_1 , Smad3, Smad7 and CTGF in experimental rats with hepatic fibrosis

SONG Shi_ling, GONG Zuo_jiong, ZHANG Quan_rong, *et al*

(Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan, 430060, China)

Abstract: [**Objective**] To investigate the effect and mechanism of JinSanE on liver fibrosis induced by exposure to carbon tetrachloride(CCl₄) in rats. [**Methods**] Fifty Wistar rats were randomly divided into four groups: healthy controls group, CCl₄ model group, Chinese herbs group 1, and group 2. Rats exposed to CCl₄ were treated with JinSanE starting at the first and fourth week respectively after CCl₄. The expression of transforming growth factor β_1 (TGF β_1), Smad3, Smad7 and connective tissue growth factor (CTGF) in liver tissues and their locations in cells were determined by immunohistochemical method. The liver histopathology was observed by an electron microscope. The content of serum hyaluronic acid(HA) was determined by radioimmunoassay. [**Result**] The expression of TGF β_1 , Smad3 and CTGF was decreased and the expression of Smad7 was increased in liver tissues of rats exposed to CCl₄ after the treatment of JinSanE ($P < 0.05$). The TGF β_1 , Smad3 and CTGF, as the immuno-positive reaction signals, were mainly expressed in cytoplasm of fiber septum, while Smad7 was mainly in liver cytoplasm. The cell structure in rats treated with Chinese herbs was normal electron microscopically, fibrous tissue was becoming thin. The content of HA was obviously higher in model group than that of healthy group ($P < 0.01$). When compared with the model rats, the content of serum HA was lower obviously in the two groups than that treated with JinSanE ($P < 0.05$). [**Conclusion**] The Chinese herbs JinSanE has protective effect against the liver injury and can inhibit liver fibrosis induced by CCl₄ exposure in rats. The mechanisms may be consisted in its ability of down-regulating TGF β_1 , smad3 and CTGF, and up-regulating Smad7 in rats.

Key words: JinSanE; hepatic fibrosis; rats; transforming growth factor β_1 (TGF β_1); Samd3; Smad7; connective tissue growth factor (CTGF)

a
c
h
M

a
t
e
M

e
n
h
C

f
o
h
c
a
e
R

水飞蓟宾卵磷脂分散体胶囊 剂溶出度测定方法的研究

任晓文, 徐为人, 连潇嫣, 马 晋, 李洪起

(天津药物研究院, 天津 300193)

摘要: [目的] 建立水飞蓟宾卵磷脂分散体胶囊剂中水飞蓟宾的溶出度测定方法。[方法] 参照中国药典 2000 年版二部附录 X C 溶出度测定第 2 法, 用紫外- 可见分光光度仪测定溶出度。[结果] 确定了以 pH 7. 8~ 8. 0 的磷酸缓冲液加 0. 5% 聚氧乙烯十二烷基醚为溶剂进行溶出度考察。测定方法和溶出方法的验证结果表明, 本方法重现性较好。[结论] 该法准确, 可靠, 能够用于水飞蓟宾卵磷脂分散体胶囊剂的溶出度测定。

关键词: 水飞蓟宾; 卵磷脂分散体; 溶出度

中图分类号: R 927 文献标识码: A 文章编号: 1672- 1519(2004) 01- 0065- 03

水飞蓟宾 (silybinin, silybin) 是菊科植物水飞蓟 (Silybum Marianum Gaertn) 果实中的一种黄酮成分。具有保肝、降血脂、抗氧化等诸多药理活性, 是世界公认疗效确切的保肝药物, 但由于它难溶于水, 口服生物利用度很低, 实验上采用了多种方法欲增加其体内的吸收程度, 有的成葡甲胺盐增加其水溶性, 有的采用 β 环糊精包合, 有的采用脂质体

技术、有的采用卵磷脂复合, 目前的研究还层出不穷^[1-4]。文献报道, 水飞蓟宾以磷脂酰胆碱等复合后, 脂溶性增加, 生物利用度大大提高。因此, 笔者采用国产注射规格的大豆卵磷脂对其进行固体分散后, 并制成胶囊。溶出度是胶囊重要的质量指标, 为了准确评价胶囊的质量, 笔者进行了溶出度测定方法学的研究。

国内对水飞蓟宾或水飞蓟类制剂的溶出度方法有不少研究报道。李钢等以人工肠液和人工胃液为

作者简介: 任晓文 (1966-), 女, 助理研究员, 主要从事药物制剂的开发和研究。

溶出介质,转篮法转速 100 r/min 测定了国产与进口水飞蓟素片的溶出度^[5]。陈乃云^[6]和陈黎^[7]等分别采用 pH 6.8 的磷酸盐缓冲液和水研究了水飞蓟宾葡甲胺的溶出度。朱弦等^[8]采用熔融法制备了水飞蓟宾的聚乙二醇(6000)分散物,以 pH 6.8 的磷酸盐缓冲液为溶出介质,转速为 50 r/min。邓莉^[9]等制备了水飞蓟宾-PVP、水飞蓟宾-泊洛沙姆 188 和水飞蓟宾-尿素 3 种固体分散体。以 pH 1.2 的人工胃液为溶媒,桨法转速 100 r/min,进行溶出度测定。笔者的试验表明水飞蓟宾卵磷脂分散体与上述各样品不同,脂溶性增加后,在上述各溶剂中均不能完全溶出,因此重点考察了溶媒的选择过程。

1 材料与仪器

ZRS-4 溶出仪(天津大学无线电厂);UV-260 紫外分光光度计(日本岛津);针筒式微孔滤膜过滤器;规格水系 Φ25 mm,孔径 0.45 μm;水飞蓟宾卵磷脂分散物对照品(35%)及胶囊(含水飞蓟宾 35 mg/粒);聚氧乙烯十二烷基醚为分析纯;其他试剂均为分析纯。

2 方法和结果

2.1 溶剂的选择

水飞蓟宾为水不溶性药物,参照文献中的溶媒,比较了人工胃液、人工肠液、水的溶出情况,发现水飞蓟宾卵磷脂分散物在人工肠液中溶出较多,但也没有达到 95% 以上,进一步在人工肠液的基础上分别加入 0.5% 十二烷基硫酸钠(SDS)、0.2% 聚氧乙烯十二烷基醚(Brij35)和 0.5% Brij35 进行试验,考察结果见表 1。结果表明,聚氧乙烯十二烷基醚为 0.5% 时,溶出完全。

表 1 溶媒选择的结果 (n=3)

溶媒	溶出百分率%			
	5 min	15 min	30 min	45 min
水	5.7	19.7	38.3	47.4
人工胃液	3.0	17.2	22.1	37.7
人工肠液	10.3	22.7	54.2	68.5
人工肠液+ 0.5% SDS	12.9	39.4	63.0	81.7
人工肠液+ 0.2% Brij35	13.2	44.4	74.1	87.5
人工肠液+ 0.5% Brij35	16.7	51.5	86.7	95.7

2.2 测定方法的确定

参照文献^[5-9]方法,采用紫外分光光度法测定溶出度。精密称取水飞蓟宾卵磷脂分散物对照品(100 mg 相当于水飞蓟宾 35 mg)适量,加 0.5% 的聚氧乙烯十二烷基醚的 pH=7.8~8.0 磷酸缓冲液

制成 1 mL 含水飞蓟宾 14 μg 的浓度溶液,作全波长扫描记录图谱,得检测波长 288 nm。

标准曲线:取水飞蓟宾卵磷脂分散物对照品约 40 mg 置 500 mL 量瓶中,加 0.5% 的聚氧乙烯十二烷基醚的 pH=7.8~8.0 磷酸缓冲液 400 mL,使溶解,加溶媒稀至刻度,摇匀。分别精密吸取 1、2、3、4、5、6 mL 置 10 mL 量瓶中,加溶媒稀至刻度,摇匀。以聚氧乙烯十二烷基醚的 pH=7.8~8.0 磷酸缓冲液为空白,在 288 nm 处测定吸收度。水飞蓟宾浓度吸收度呈线性良好,回归方程 $C = 0.759 + 80.275x$, $r = 0.9998$ 。

回收率:取水飞蓟宾卵磷脂分散物对照品约 40 mg 置 500 mL 量瓶中,并称取辅料 60 mg 置同一量瓶中,加 0.5% 的聚氧乙烯十二烷基醚的 pH=7.8~8.0 磷酸缓冲液 400 mL,超声振荡 1 h 使完全溶解,加溶媒稀至刻度,摇匀。过滤,取续滤液 5 mL 置 10 mL 量瓶中,加溶媒稀至刻度,摇匀,作为供试品溶液。在 288 nm 处测定吸收度。水飞蓟宾平均回收率为 99.18%,峰面积(RSD)为 1.25% (n=6),辅料不干扰测定。

测定溶液的稳定性考察:取标准曲线项下的样品,置室温下放置,于 1、2 h 和 4 h 测定吸收度,结果表明,样品溶液在 4 h 内比较稳定,紫外吸收度没有变化。

2.3 溶出方法的选择

以 100 r/min 为转速,比较了篮法与桨法的溶出结果;采用桨法分别以 50 r/min,100 r/min 考察了转速对溶出的影响。结果表明,桨法 100 r/min 时该药溶出完全。见表 2。

表 2 溶出方法的考察结果 (n=3)

方法	溶出百分率%			
	5 min	15 min	30 min	45 min
篮法, 100 r/min	11.7	39.5	68.9	72.7
桨法, 100 r/min	18.0	47.7	82.5	93.8
桨法, 50 r/min	9.2	28.7	57.7	68.4

2.4 样品溶出度曲线的测定

批内均一性:取本品,照溶出度测定法(中国药典 2000 年版二部附录 XC,第 2 法),以含 0.5% 的聚氧乙烯十二烷基醚的磷酸缓冲液 (pH=7.8~8.0) 1 000 mL 为溶媒,温度 (37±0.5) °C,转速 100 r/min,依法操作。经不同时间取溶液 10 mL,滤过,弃去初滤液精密量取续滤液 2 mL,加入上述溶剂稀释至 5 mL,摇匀,作为供试品溶液。在 288 nm 波长处测定吸收度,计算每粒溶出量。同一批的胶

囊进行均一性试验结果见表3。

表3 水飞蓟宾胶囊的均一性试验 (%)

批次	溶出百分率			
	5 min	15 min	30 min	45 min
1	21.7	59.7	78.3	97.4
2	13.0	47.2	72.1	94.7
3	10.3	22.7	64.2	92.5
4	10.9	37.4	69.0	95.2
5	16.6	54.3	77.7	90.5
6	6.9	50.6	82.0	94.3

批间均一性: 取3批胶囊溶出样品, 分别照上述溶出度方法测定样品溶出量。不同批次的胶囊溶出结果见表4。

表4 3批胶囊溶出度结果 (%)

批次	溶出百分率			
	5 min	15 min	30 min	45 min
1	15.8±4.9	56.0±9.3	82.1±7.1	92.4±5.6
2	9.4±1.0	49.9±4.5	75.5±3.6	91.6±3.4
3	16.7±4.5	62.9±9.0	81.7±3.3	94.9±3.1

以上结果显示: 水飞蓟宾固体分散体胶囊批内和批间溶出度结果基本一致, 重现性较好。

3 讨论

水飞蓟宾为水溶性和脂溶性都较差的药物, 据国外文献报道, 水飞蓟宾以磷脂酰胆碱等复合后, 脂溶性增加, 生物利用度在大鼠提高了十几倍, 在人体提高了2~3倍。以大豆卵磷脂对水飞蓟宾进行固体分散后, 样品的溶解性质有了较大的改变, 在常规的方法下不能完全溶出, 笔者通过试验确定以pH7.8~8.0的磷酸缓冲液加0.5%聚氧乙烯十二烷基醚为溶剂进行溶出度考察。测定方法和溶出方法的验证结果表明, 本方法重现性较好, 能够用于

样品的质量控制。

通常选择溶出度试验的溶剂尽量接近生理条件, 水、人工肠液和人工胃液都是首选的溶剂。对于实在难溶的药物, 加入表面活性剂也是经常采用的方法, 十二烷基硫酸钠是最常用的表面活性剂, 但对本品增溶效果不理想, 而非离子型的聚氧乙烯十二烷基醚增溶效果明显。本实验溶出条件下测定的结果与体内吸收的相关性应进一步做实验证实。

参考文献:

- [1] Schriewer H, Rauen HM. The effect of silymarin - N - methylglucamine salt and silybin - dihemisuccinate on (1 - 14C) - acetate incorporation in rat liver lipids [J]. *Arzneimittelforschung*. 1976, 26(2): 235.
- [2] Barzaghi N, Crema F, Gatti G, *et al*. Pharmacokinetic studies on IdB 1016, a silybin - phosphatidylcholine complex, in healthy human subjects [J]. *Eur J Drug Metab Pharmacokin*. 1990, 15(4): 333.
- [3] Arcari M, Brambilla A, Brandt A, *et al*. A new inclusion complex of silybinin and beta - cyclodextrins: in vitro dissolution kinetics and in vivo absorption in comparison with traditional formulations [J]. *Boll Chim Farm*. 1992, 131(5): 205.
- [4] Maheshwari H, Agarwal R, Patil C, *et al*. Preparation and pharmacological evaluation of silybinin liposomes [J]. *Arzneimittelforschung*. 2003, 53(6): 420.
- [5] 李钢, 盛维强. 国产与进口水飞蓟素片的溶出度研究 [J]. *药理学杂志* 2000, 1(4): 219.
- [6] 陈乃云. 水飞蓟宾葡甲胺片溶出度测定的研究 [J]. *甘肃中医学院学报*, 1994, 11(1): 54.
- [7] 陈黎. 水飞蓟宾葡甲胺质量标准研究 [J]. *中草药*, 2002, 23(12): 1083.
- [8] 朱弦, 青松, 韩惠兰, 等. 水飞蓟安素固体分散体中水飞蓟宾溶出度的研究 [J]. *延边大学医学学报*, 2001, 24(1): 21.
- [9] 邓莉, 邹豪. 水飞蓟宾固体分散体的制备及体外溶出研究 [J]. *第二军医大学学报*, 2000, 21(10): 962.
- [10] 陈黎, 张红梅. 水飞蓟宾甲胺片溶出度研究 [J]. *江苏药学与临床研究*, 2002, 10(4): 37.

(收稿日期: 2003-10-20)

Study on dissolution test method of Silybin Solid Dispersion Capsules

REN Xiao_wen, XU Wei_ren, LIAN Xiao_yan, *et al*

(Tianjin Institute of Medicine, Tianjin, 300193, China)

Abstract: [Objective] To establish a method in determining the dissolution of silybin solid dispersion capsules. [Methods] According to the description in Chp. 2000. Vol II. Appendix XC, the dissolution of silybin solid dispersion capsules was determined by UV-VIS spectrophotometer. [Results] The selected media for dissolution test is phosphate buffer solution with 0.5% Brij35 (pH7.8~8.0). The dissolution of capsules has good reproducibility. [Conclusion] The method is considered to be an accurate and reliable dissolution determination for silybin capsules.

Key words: silybin; solid; dispersion; dissolution