

图 6 细胞活性随时间变化曲线

表 4 细胞生长统计数据表

组别	生长速率 (g/L·d)	比生长速率 (d <sup>-1</sup> )	倍增时间 (d)	干基密度 (g/L)
有机氮	0.89	0.064	14	29
无机氮	0.79	0.058	16	28
碳源+ 有机氮	1.58	0.117	11	45
空白	0.74	0.056	18	26

从图 6中可以看出,在培养的前 10 d各组实验中细胞活力基本相同,约等于接种时的细胞活力。而在培养的后 10 d,对照组细胞活力迅速下降到一个较低的水平;补加有机氮与补加无机氮实验组中细胞变化情况相似,活力下降的现象均出现在第 12 天,表明单独补加氮源对延缓细胞活力下降的作用有限。而同时补加碳氮的实验组中细胞活力则继续保持在高水平上,没有出现下降。补充碳源物质才是抑制对照组中第 10 天出现的细胞活力下降的有效手段。

总结以上实验现象,可以推测:培养 10 d后, B5 培养基中碳源消耗完毕,成为抑制细胞生长与细胞活力下降的主要原因。而此时培养基中氮源还比较充分,补充有机氮和无机氮对细胞生物量的增加和维持较高的细胞活性没有显著影响。

### 5 讨论

在南方红豆杉细胞悬浮培养过程中, B5 培养基中的各元素基本满足细胞生长需要,培养中后期氮源和磷源仍能满足细胞生长代谢的需要,因此补充氮、磷对细胞生长和细胞活力没有显著影响;但碳源物质却消耗完毕,成为制约细胞生长的主要因素,所以补充碳源则可以克服在培养后期培养基中出现的碳源缺乏现象,使细胞维持较高的生长速率和细胞活性,为采用流加的方式进行大规模红豆杉细胞悬浮培养做了初步的尝试。

### 参考文献:

- [1] 元英进,刘家新,卢伟伸. 大规模细胞培养生产紫杉醇的潜力. 第九届全国化学工程科技报告会论文集 [C]. 1998.
- [2] Fett-Neto A G, Melanson S J, Sakata K, et al. Improved growth and taxol yield in developing calli of *Taxus cuspidata* by medium composition modification [J]. Bio/Technol, 1993, 11(6): 731-734.
- [3] Fett-Neto A G, Zhang W Y, Dicosmo F. Kinetics of taxol production, growth and nutrient uptake in cell suspensions of *Taxus cuspidata* [J]. Biotechnology and Bioengineering, 1994, 44(2): 205-210.
- [4] 孙敬三,桂耀林. 植物细胞工程实验技术 [M]. 北京: 科学技术出版社, 1995.
- [5] 刘家新. 红豆杉细胞培养 pH 值调控与生化反应器操作策略研究 [D]. 天津大学硕士论文.

## 水飞蓟素固体分散体中总黄酮的测定

李凤前,胡晋红,朱全刚\*

(第二军医大学长海医院 药学部,上海 200433)

摘要:目的 测定水飞蓟素固体分散体制剂中总黄酮。方法 采用一阶导数紫外分光光度法。结果 以 1:3, 1:6 和 1:9 药物/载体比例处方制成的固体分散体中总黄酮的量分别为 27.72%、15.59% 和 10.98%。结论 该法可避开空白 PEG-6000 载体对固体分散体中总黄酮测定的干扰,操作简便,结果准确可靠。

关键词:水飞蓟素;固体分散体;黄酮;一阶导数紫外分光光度法

中图分类号: R286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2002)01-0031-03

### Quantitation of flavonoids in silymarin loaded solid dispersion system

LI Feng-qian, HU Jin-hong, ZHU Quan-gang

(Department of Pharmaceutical Sciences, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

\* 收稿日期: 2001-03-13

作者简介: 李凤前 (1970-), 男, 理学博士, 现于第二军医大学长海医院进行博士后研究, 研究方向: 药物新型给药系统。

**Key words** silymarin; solid dispersion system; flavonoids; first derivative ultraviolet spectro-photometry

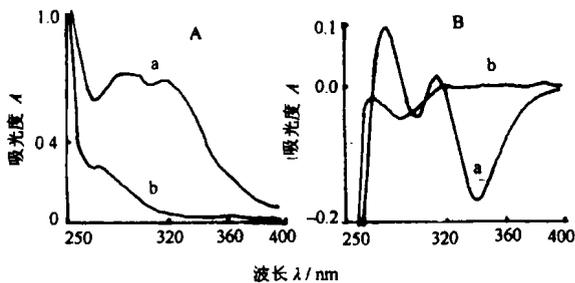
水飞蓟素 (silymarin, 简称 Sily) 是从菊科水飞蓟属植物水飞蓟 *Silybum marianum* L. Gaertn. 种子中提取的黄酮木脂体类化合物, 具有抗肝胆中毒、保护肝细胞膜和改善肝功能等作用<sup>[1]</sup>, 对肝纤维化的防治也有较好疗效。Sily 难溶于水, 不利于胃肠道吸收, 因此, 我们采用固体分散技术, 以水溶性载体材料聚乙二醇 (PEG-6000), 将其制成了固体分散体, 以增加 Sily 的溶出, 提高其口服生物利用度。为了对 Sily 固体分散体进行定量控制, 选择总黄酮<sup>[2]</sup>作为其质控指标之一。本文建立并采用一阶导数紫外分光光度法测定固体分散体中总黄酮的含量, 该法操作简便, 结果准确可靠。

### 1 仪器与试剂

UV-2100 紫外分光光度计 (日本岛津); 水飞蓟素及其对照品由辽宁盘锦华成制药厂提供; 聚乙二醇 (PEG-6000, 上海化学试剂公司进品分装); 实验用水为去离子蒸馏水

### 2 实验方法与结果

2.1 载体材料干扰的排除与测定波长的选择: 以 0.01 mol/L NaOH 溶液为介质, 配制一定浓度的 Sily 及空白 PEG-6000 载体溶液, 进行紫外扫描, 结果见图 1-A 可见, 空白 PEG-6000 载体对 Sily 的测定存在一定干扰, 故对其进行一阶导数扫描, 其结果见图 1-B。采用一阶导数光谱法, 可消除空白 PEG-6000 载体对 Sily 测定的干扰。通过测定 338 nm 处一阶导数的振幅值 ( $H$ ), 可对 Sily 固体分散体中的总黄酮进行含量测定。



a-Sily; b-空白 PEG-6000 载体

图 1 紫外光谱图 (A) 与一阶导数紫外光谱图 (B)

2.2 标准曲线的制备: 精密称取 Sily 对照品 16.9 mg 于 25 mL 量瓶中, 以 0.01 mol/L NaOH 溶液溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得标准溶液贮备液。分别吸取上述标准贮备液 0.3, 0.45, 0.6, 0.9 和

1.5 mL 移入 50 mL 量瓶中, 以 0.01 mol/L NaOH 溶液稀释至刻度, 配制一系列浓度的标准溶液。在 338 nm 波长处, 分别测定  $H$ , 以  $|H|$  对浓度  $C$  进行线性回归, 得标准曲线的回归方程:  $C = 124.848 |H| - 0.0726$ ,  $r = 0.9999$ , 在  $4 \sim 20 \mu\text{g/mL}$  浓度范围内线性良好。

2.3 回收率试验: 取适量空白 PEG-6000 载体, 分别置于 50 mL 的量瓶中, 加入标准贮备液, 以 0.01 mol/L NaOH 溶液配成高、中、低 3 种不同浓度 (模拟处方比例), 充分振摇混匀, 超声波处理 3 min, 过滤, 弃去初滤液, 取续滤液照“标准曲线”项下操作, 测定总黄酮的浓度, 与加入浓度进行比较, 可得高、中、低浓度的平均回收率分别为: 101.2%、98.93% 和 100.24% ( $n = 3$ ), 说明该法具有较好的准确性。

2.4 固体分散体中总黄酮的测定: 取 1:3, 1:6, 1:9 三种不同药物载体比例处方制成的固体分散体各适量, 分别精密称取约 30, 50 和 60 mg 样品, 置于 50 mL 量瓶中, 加 0.01 mol/L NaOH 溶液至刻度, 充分振摇混匀, 超声 3 min, 过滤, 弃其初滤液, 取续滤液 1.0 mL 移入 10 mL 量瓶中, 以 0.01 mol/L NaOH 溶液稀释至刻度, 摇匀, 按“标准曲线”项下的方法测定  $H$ , 根据标准曲线回归方程计算固体分散体中总黄酮所占百分含量, 结果见表 1。

表 1 固体分散体中所含总黄酮 ( $n = 3$ )

药物载体 (w/w)	总黄酮含量 (%)	RSD (%)
1:3	27.72	2.45
1:6	15.59	2.56
1:9	10.98	5.10

### 3 讨论

水飞蓟素为混合黄酮类化合物, 其检测大多采用薄层扫描法<sup>[3]</sup>, 该法操作不便, 条件要求较苛刻, 不易控制。HPLC 法测定兼具分离功能, 可检测各单一组分的含量, 但水飞蓟素保肝作用的主要组分为黄酮类化合物, 因此, 对总黄酮的测定作为 Sily 制剂的质控指标具有较好的代表性。

直接采用水溶液难于配制 Sily 的标准浓度, 我们曾采用吐温-80 脱氧胆酸钠盐等表面活性剂作为增溶剂, 结合超声波分散处理, 以增加药物的溶解度, 但效果不佳。考虑到 Sily 可溶于稀碱液, 因此采用 0.01 mol/L NaOH 溶液作为测定介质。紫外分光

光度法操作简便易行<sup>[4]</sup>,特别是在处方样品筛选时,操作非常方便,大大提高工作效率。一阶导数紫外光谱法可排除 PEG 等载体材料对目标药物测定的干扰,对于 Sily 固体分散体质量标准的建立以及随后的相关基础研究工作具有重要意义。

参考文献:

- [1] 孙铁民,李 锐.水飞蓟素药理研究进展[J].中草药,2000,31(3): 229-231.
- [2] 刘本亮,杨 锡.薄层扫描法测定益肝灵胶囊中水飞蓟素的含量[J].中成药,1999,21(4): 180-181.
- [3] 定天明,施蕴华,田颂九,等.水飞蓟主要有效成分分离与分析方法概述[J].中草药,1999,30(8): 637-638.
- [4] 胡晋红,朱 宇,薛佩华.二阶导数光谱法测定酮洛芬体外经皮渗透量[J].药学报,1997,32(7): 542.

## 瓜蒌中有机氯农药残留量测定研究

薛 健,俞敏倩,刘惠灵,张国良,张曙明,陈建民\*

(中国医学科学院 中国协和医科大学药用植物研究所,北京 100094)

**摘要:**目的 测定瓜蒌中有机氯农药残留。方法 利用气相色谱法同时测定瓜蒌中 9 种有机氯农药的残留量。结果 方法回收率为 78.0%~102.0%,RSD<10%,所测 10 个样品中总 BHC 及总 DDT 含量 <0.05 μg/g。结论 测定结果可见本法符合农药残留分析要求,但应制定相应限量标准。

**关键词:**瓜蒌;有机氯农药;残留量;气相色谱法

中国分类号: R286.02 文献标识码: B 文章编号: 0253-2670(2002)1-0033-02

### Determination of residue of organic chlorine pesticides in *Fructus Trichosanthis*

XUE Jian, YU Min-qian, LIU Hui-ling, ZHANG Guo-liang, ZHANG Shu-ming, CHEN Jian-min

(Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Science and

Peking Union Medical College, Beijing 100094, China)

**Key words** *Fructus Trichosanthis*; organic chlorine pesticides; residue; GC

瓜蒌为常用药材,有关瓜蒌的农残测定方法尚未见报道

#### 1 实验部分

1.1 仪器及试剂: Varian 6000 气相色谱仪,配备 <sup>63</sup>N 电子捕获检测器,4270 记录仪; SE-54 石英毛细管柱 (30 m×0.32 mm×0.25 μm, 迪马公司); T-31 型超声波清洗器 (德国)

农药标准品混合样 (α-BHC β-BHC γ-BHC PCNB δ-BHC PP-DDE PP-DDD OP-DDT PP-DDT 含量均为 100 μg/mL, 国家标准物质研究中心提供)。试剂均为分析纯,水为重蒸水,正己烷 50 mL 浓缩为 5 mL 经气相色谱仪检查无干扰峰。

瓜蒌样品共 10 个,由北京中医研究院中药研究所曹志茂教授提供。

1.2 提取、净化: 样品阴干后粉碎,过 20 目筛,精密称取混匀的样品 2 g 于 100 mL 具塞三角瓶中,加入 20 mL 水浸泡过夜,加 40 mL 丙酮并称重,超声波提取 20 min,补足重量,再加入 6 g NaCl 30 mL 二氯

甲烷并称重,超声 15 min,补足重量,静置 (过夜)使两相完全分层,取有机相于 100 mL 具塞三角瓶杯中,加入适量无水硫酸钠脱水,精确取脱水后的有机相 35 mL 于 100 mL 蒸馏瓶中,40℃ 水浴浓缩,用正己烷替换数次,浓缩近干。将浓缩后的残渣用正己烷定量转移至 10 mL 具塞刻度试管中定容至 5 mL,小心加入 1 mL 浓硫酸,振摇 1 min,静置过夜,精密吸取上清液 4 mL 于 5 mL 刻度离心管中,水浴 (低温) 或自然挥发至 1 mL 备用。

1.3 色谱条件: 载气: 高纯氮,柱前压: 59 kPa; 进样口温度: 210℃,检测器温度: 300℃; 柱升温程序: 140℃→210℃ (10℃/min)→250℃ (8℃/min); 进样量: 1 μL,外标法定量。

1.4 标准曲线: 用标准贮备液分别配制出 0.5, 0.1, 0.05, 0.01 μg/mL 的标准溶液,进样后绘制标准曲线,以试样浓度 (Y, μg/mL) 为纵坐标,以峰面积为横坐标,进行回归,结果见表 1。

#### 2 实验结果

\* 收稿日期: 2001-02-26

基金项目: 国家“九·五”攻关项目 (96-903-02-02)

作者简介: 薛 健 (1964-),女,副研究员,主要从事药物成分分析及质量标准研究工作。