

# 壳聚糖苦丁茶纳米粒的制备及理化性质考察

黄秋燕<sup>1</sup>, 张宏亮<sup>2</sup>, 王捷<sup>3</sup>, 黎渊弘<sup>2\*</sup>

(1. 广西医科大学药学院, 南宁 530021; 2. 广西医科大学第一附属医院, 南宁 530021;  
3. 广西医科大学制药厂, 南宁 530021)

**[摘要]** **目的:**制备壳聚糖苦丁茶纳米粒并考察其理化性质和体外释药性能。**方法:**采用梯度体积分数乙醇提取苦丁茶总黄酮,利用紫外-分光光度法测定总黄酮含量,检测波长 510 nm。通过离子交联法制备壳聚糖苦丁茶纳米粒,考察其形态、粒子分布、包封率、载药量及体外释放情况。**结果:**苦丁茶中总黄酮质量分数 31.84%。纳米粒呈球形,粒径 200~400 nm,多分散系数 0.137。壳聚糖苦丁茶纳米粒最佳处方为壳聚糖 1 g·L<sup>-1</sup>,三聚磷酸钠 1 g·L<sup>-1</sup>,苦丁茶总黄酮 1 g·L<sup>-1</sup>。体外释放试验显示该纳米粒在前 2 h 有突释效应,释放量 45.6%~48.9%,24 h 总释放量 91.9%。**结论:**壳聚糖纳米粒可作为苦丁茶的优良载体,为新型降脂制剂的开发提供参考。

**[关键词]** 壳聚糖; 苦丁茶; 三聚磷酸钠; 纳米粒; 总黄酮

**[中图分类号]** R283.6;R944.2;R942;R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)06-0010-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.sjfx.2015060010

**Preparation and Characterization of Chitosan-Kudingcha Nanoparticles** HUANG Qiu-yan<sup>1</sup>, ZHANG Hong-liang<sup>2</sup>, WANG Jie<sup>3</sup>, LI Yuan-hong<sup>2\*</sup> (1. College of Pharmaceutical, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 2. The First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 3. Pharmaceutical Factory of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

**[Abstract]** **Objective:** To prepare chitosan-Kudingcha nanoparticles and investigate its physicochemical properties and *in vitro* release characteristics. **Method:** Total flavonoids in *Ilex kudingcha* were extracted by gradient ethanol and its content was determined by UV-spectrophotometer, detection wavelength was 510 nm. Chitosan-Kudingcha nanoparticles were prepared by ionic crosslinking method, morphology, particle distribution, drug-loading, encapsulation efficiency and *in vitro* release rate of this preparation were examined. **Result:** The content of total flavonoids in *I. kudingcha* was 31.84%. These nanoparticles were spherical in shape and the size range was between 200-400 nm, the polydispersity coefficient was 0.137. Optimal prescription of chitosan-Kudingcha nanoparticles was as following: concentrations of chitosan, sodium tripolyphosphate and total flavonoids of 1 g·L<sup>-1</sup>. *In vitro* release profile showed that these nanoparticles had sudden release effect in the first two hours with cumulative release amount of 45.6% to 48.9%. Total release amount was 91.9% in 24 hours. **Conclusion:** Chitosan nanoparticles is an excellent carrier for *I. kudingcha*. This study can develop a new idea for development of lipid-lowering medicinal preparation.

**[Key words]** chitosan; *Ilex kudingcha*; sodium tripolyphosphate; nanoparticles; total flavonoids

天然药物尤其是传统中草药,由于其安全、毒副作用少且作用效果独特,已成为降脂药物研究的热点。苦丁茶是广西民间的一种常用植物,已被收载于广西壮族自治区壮药质量标准(DYB45-

GXZYC0107-2011),具有清热解毒、杀菌消炎、抗氧化、活血脉、调节血脂等功效,关于其在降脂方面的研究已有大量文献报道<sup>[1-2]</sup>。但苦丁茶味苦,致使其顺应性较差,同时苦丁茶用于降脂时通常需要较

**[收稿日期]** 20140709(017)

**[基金项目]** 广西壮族自治区卫生厅中医药科技专项(GZZJ13-17)

**[第一作者]** 黄秋燕,在读硕士,主管药师,从事药理学研究,Tel:18377102539,E-mail:huangqy84@126.com

**[通讯作者]** \*黎渊弘,博士,副主任药师,从事药理学研究,Tel:010-5356379,E-mail:zyli2007@163.com

大剂量,但大剂量服用时对肾脏有一定损害。

纳米技术已被广泛应用于医学、材料学、生命科学等领域<sup>[3]</sup>。由于纳米粒有更小的粒径和更大的比表面积,且能被动靶向于肝脏,因此可大大提高药物的生物利用度。此外,纳米化还可掩盖药物的不良味道。推测将苦丁茶纳米化后可明显解决其因给药剂量大而引起的肾损害及服用顺应性差的问题。王舒舒<sup>[4]</sup>利用离子凝胶法制备了苦丁茶多酚-壳聚糖纳米微球,可增加苦丁茶多酚的稳定性,提高生物利用度,同时还具有缓释作用。刘占军等<sup>[5]</sup>制备的姜黄素纳米粒可避免姜黄素在水中分解,同时解决了姜黄素在体内吸收差和不稳定易降解等问题,提高了该药物的生物利用度。李楠等<sup>[6]</sup>制备的黄芩素 PLGA 纳米粒具有良好的缓释效应,可显著延长药物的释放时间,控制药物平稳释放,同时该纳米粒还有良好的细胞相容性,可提高细胞对药物浓度的耐受性。本实验拟采用离子交联法制备苦丁茶纳米粒,并考察其理化性质和体外释放性能,为新型降血脂药物的开发提供参考。

## 1 材料

Sorvall Biofuge Stratos 型高速离心机(德国 Thermo 公司), Alpha1-4 LSC 型冷冻干燥机(德国 Martin Christ 公司), L-117 小型喷雾干燥器(北京来亨仪器设备有限公司), TU-1901 型双光束紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司), Nano-S 型激光粒度分析仪(英国马尔文仪器有限公司), H-7650 型透射电子显微镜(日本日立公司)。苦丁茶购自广西壮族自治区大新县龙门乡苦丁村皇氏茶厂,经广西医科大学制药厂质检科高级工程师王捷鉴定为冬青科苦丁茶 *Ilex kudingcha* 的干燥嫩叶;壳聚糖(山东奥康生物科技有限公司,脱乙酰度 90.2%),芦丁对照品(北京索莱宝科技有限公司,批号 S90103,纯度  $\geq 98\%$ ),三聚磷酸钠(TPP,美国 Aladdin 公司),水为纯化水,其他试剂均为分析纯。

## 2 方法和结果

**2.1 苦丁茶总黄酮的提取** 称取苦丁茶适量,粉碎成粗粉,加 10 倍量 95% 乙醇浸提 2 d,过滤,滤渣加 10 倍量 75% 乙醇浸提 2 d,过滤,滤渣加 10 倍量 50% 乙醇浸提 2 d,过滤,滤渣加 10 倍量 20% 乙醇浸提 2 d,过滤,合并上述所有滤液<sup>[7]</sup>,浓缩,得粗品。粗品加水混匀,过滤,取上清液,加入壳聚糖溶液混匀,反复过滤,取上清液,13 000  $r \cdot \min^{-1}$  高速离心 20 min,冷冻干燥,即得苦丁茶总黄酮提取物。

## 2.2 苦丁茶总黄酮的含量测定

**2.2.1 检测波长的确定** 取适量苦丁茶总黄酮提取物和芦丁对照品,分别置于 10 mL 量瓶中,加 30% 乙醇适量,超声使溶解,精密加入 5% 亚硝酸钠溶液 0.3 mL,摇匀,放置 6 min;加 10% 硝酸铝溶液 0.3 mL,摇匀,放置 6 min;加 1  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  氢氧化钠溶液 4 mL,加 30% 乙醇稀释至刻度,摇匀,放置 10 min。以相应试剂为空白,进行紫外全波长扫描<sup>[7-8]</sup>。结果显示对照品和提取物的最大吸收峰均出现在 510 nm,故选择检测波长 510 nm。

**2.2.2 芦丁标准曲线** 精密称取芦丁对照品 11 mg,置于 100 mL 量瓶中,加入适量 30% 乙醇,超声使溶解,加 30% 乙醇定容至刻度,摇匀,得对照品溶液。精密量取对照品溶液 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL,分别置于 10 mL 量瓶中,按 2.2.1 项下方法显色并测定吸光度(A)。以 A 为纵坐标,质量浓度(C)为横坐标,得回归方程  $A = 0.0132C + 0.0017$  ( $r = 0.9999$ ),线性范围 10.81 ~ 54.05  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

**2.2.3 样品测定** 精密称取苦丁茶提取物 3 g,置于 100 mL 量瓶中,加 30% 乙醇超声使溶解并定容至刻度,摇匀,过滤,精密量取续滤液 1.0 mL 置于 100 mL 量瓶中,加 30% 乙醇定容至刻度,摇匀,量取 4.0 mL 置于 10 mL 量瓶中,按 2.2.1 项下方法显色,于 510 nm 处测定 A,计算总黄酮质量分数 31.84%, RSD 0.2%。

**2.3 壳聚糖苦丁茶纳米粒的制备** 将壳聚糖溶于 1% 乙酸中,配成不同浓度的壳聚糖溶液。TPP 溶于水中配成不同浓度的 TPP 溶液。取一定体积壳聚糖溶液,于 600  $r \cdot \min^{-1}$  室温磁力搅拌下,缓缓加入苦丁茶溶液,用 4 号注射器针头缓缓注入 TPP 溶液,反应 45 min,出现蓝色乳光,即得<sup>[9-11]</sup>。

**2.4 壳聚糖苦丁茶纳米粒的表征** 壳聚糖苦丁茶纳米粒粒子呈球状,表面光滑。经测定,纳米粒粒径 200 ~ 400 nm,分布集中,多分散系数 0.137。

**2.5 包封率的测定** 采用超速离心法分离游离药物与纳米粒。分别考察苦丁茶总黄酮、壳聚糖及 TPP 质量浓度对包封率的影响,固定其中 2 个因素的质量浓度 1  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,另一因素质量浓度分别 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,结果见图 1。表明包封率受总黄酮质量浓度的影响较大,苦丁茶浓度越高,包封率越低;壳聚糖浓度对苦丁茶包封率有一定影响,于 1  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  时包封率达最高。TPP 浓度对包封率的影响不大。

**2.6 载药量的测定** 固定壳聚糖和 TPP 的质量浓

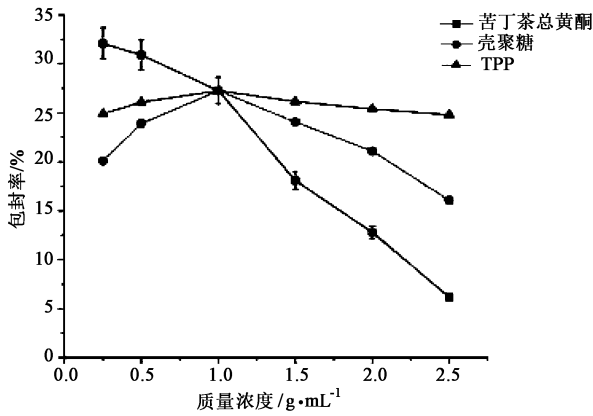


图 1 不同因素对壳聚糖苦丁茶纳米粒包封率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )  
Fig. 1 Influence of various factors on encapsulation efficiency of chitosan-Kudingcha nanoparticles ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

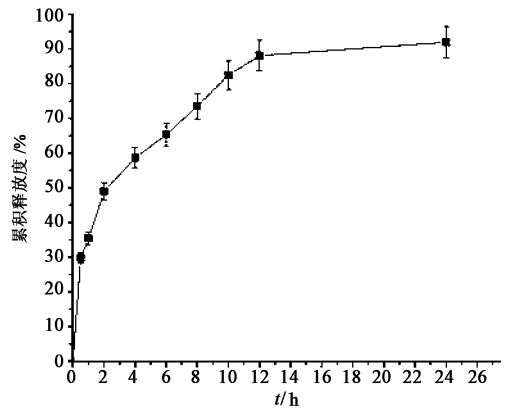


图 2 壳聚糖苦丁茶纳米粒体外累积释放曲线 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )  
Fig. 2 *In vitro* cumulative release curve of chitosan-Kudingcha nanoparticles ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

度均为  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 苦丁茶质量浓度分别为 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 计算载药量分别为 3.3%, 15.8%, 23.3%, 25.8%, 27.2%, 28.1%。

**2.7 体外释药性能考察** 将纳米粒胶体液高速离心 ( $15\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 30 min, 下同), 弃去上清液, 得纳米粒子, 用水洗涤, 冷冻干燥, 得壳聚糖苦丁茶纳米粒。准确称量适量冻干纳米粒粉末, 加入 pH 7.4 磷酸盐缓冲液 10 mL, 置  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  恒温精密数控摇床中于  $50 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  振摇, 定时高速离心, 移取上清液 1.0 mL, 同时补加新鲜的 pH 7.4 磷酸盐缓冲液 1.0 mL, 取样时间点分别为 0.5, 1, 2, 4, 6, 12, 24 h。上清液于 510 nm 处测定 A, 根据标准曲线计算苦丁茶总黄酮含量, 计算各时间点累积释放率 (Q)。

$$Q = \frac{C_i \times V + V_i \sum_{n=0}^{i-1} C_n}{W \times X} \times 100\%$$

式中  $C_i$  为各时间点测得的苦丁茶质量浓度,  $C_n$  为取样浓度,  $V$  为释放介质总体积,  $V_i$  为取样体积,  $W$  为冻干苦丁茶纳米粒质量,  $X$  为载药量。体外释放情况见图 2。结果表明壳聚糖苦丁茶纳米粒在磷酸盐缓冲液中的释放过程主要分为 3 个阶段, 前 2 h 有突释, 突释量 45.6% ~ 48.9%; 在 2 ~ 12 h 内, 药物释放较为平稳; 12 h 后释放量基本维持不变, 24 h 总释放量 91.9%。

### 3 讨论

苦丁茶已被收入《广西壮族自治区壮药质量标准》第二卷, 但尚无关于苦丁茶的定性和定量指标。通过定性试验发现苦丁茶中含有较多的类黄酮物质, 且多以黄酮苷类形式存在。生物类黄酮泛指 2 个苯环通过中央三碳相互联结而成的, 以 2-苯基色原酮为母核的化合物; 其溶解度因结构及

存在状态不同而存在很大差异。黄酮类物质溶于乙醇等极性溶剂, 但在水中溶解度较小, 故本文选择乙醇梯度提取苦丁茶, 通过不同体积分数乙醇可提取出不同极性的黄酮类物质<sup>[12]</sup>。利用壳聚糖本身的絮凝特性来纯化苦丁茶提取物<sup>[13-15]</sup>, 不会引入新的杂质, 还会使苦丁茶提取物的纯度得以提高。

芦丁具有典型的黄酮类结构和紫外特征, 在很多含有黄酮类物质的植物中广泛存在, 且含量较高<sup>[7]</sup>。此外, 芦丁比较容易分离得到纯体, 作为对照品较易得, 故选择芦丁为总黄酮类物质含量测定的指标成分。包封率主要考察药物的损失量, 在制备纳米粒时, 包封率越高越好, 但包封率过高时载药量往往偏低, 载药量过低又会使纳米粒失去药用。本文应用超速离心法分离游离药物与纳米粒, 此法操作简便快速。预试验发现苦丁茶总黄酮、壳聚糖和 TPP 的质量浓度均对包封率有影响, 但以苦丁茶总黄酮质量浓度的影响最大, 其浓度越低, 包封率越高, 但浓度过低时其载药量大大减少, 无实际意义。故综合包封率和载药量考虑, 选取  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  苦丁茶总黄酮。

壳聚糖苦丁茶纳米粒体外释放的开始 2 h 内释放量 45.6% ~ 48.9%, 提示有突释, 可能是由于苦丁茶总黄酮部分被吸附于纳米粒表面, 从而迅速释放入介质中; 在 2 ~ 12 h 内, 包裹于纳米粒内的苦丁茶总黄酮通过孔道缓慢释放入介质中, 故释放曲线较为平缓; 12 h 后残存在纳米粒内的苦丁茶总黄酮已基本释放完毕, 故曲线基本无变化。

### [参考文献]

[1] Li L, Xu L J, Ma G Z, et al. The large-leaved Kudingcha

- (*Ilex latifolia* Thunb and *Ilex kudingcha* C. J. Tseng): a traditional Chinese tea with plentiful secondary metabolites and potential biological activities[J]. *J Nat Med*, 2013, 67(3):425-437.
- [2] 符翠莉,蒙大平,荣延平,等. 苦丁茶老叶水提取物降血脂作用实验研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16(5):244-245.
- [3] Williams D. Defining nanotechnology[J]. *Med Device Technol*, 2008, 19(3):8-10.
- [4] 王舒舒. 苦丁茶多酚-壳聚糖纳米微球的制备及其性能评价[D]. 南京:南京农业大学, 2010.
- [5] 刘占军,韩刚,于九皋,等. 姜黄素纳米粒的制备和释药性能[J]. *中药材*, 2009, 32(2):277-279.
- [6] 李楠,刘志东,范丽丽,等. 黄芩素 PLGA 纳米粒的体外评价及细胞相容性研究[J]. *天津中医药大学学报*, 2014, 33(1):28-31.
- [7] 何翔,黄荣增,范彦博,等. 苦丁茶总黄酮不同提取方法的比较[J]. *湖北中医杂志*, 2010, 32(4):74-75.
- [8] 石秀梅,邹辉,李春彦. 近年来茶叶中总黄酮类化合物测定方法研究概况[J]. *中国民族民间医药*, 2007, 88(5):273-274.
- [9] Sonaje K, Lin K J, Wey S P, et al. Biodistribution, pharmacodynamics and pharmacokinetics of insulin analogues in a rat model: Oral delivery using pH-responsive nanoparticles vs. subcutaneous injection[J]. *Biomaterials*, 2010, 31(26):6849-6858.
- [10] Elsayed A, Mayyas A R, Qinna N, et al. Chitosan-sodium lauryl sulfate nanoparticles as a carrier system for the *in vivo* delivery of oral insulin[J]. *AAPS Pharm Sci Tech*, 2011, 12(3):958-964.
- [11] Sadeghi A M M, Dorkoosh F A, Avadi M R, et al. Preparation, characterization and antibacterial activities of chitosan, *N*-trimethyl chitosan (TMC) and *N*-diethylmethyl chitosan (DEMC) nanoparticles loaded with insulin using both the ionotropic gelation and polyelectrolyte complexation methods[J]. *Int J Pharm*, 2008, 355(1/2):299-306.
- [12] 陈志伟,陈坤,胡银川,等. 苦丁茶总黄酮提取工艺优化研究[J]. *食品研究与开发*, 2012, 33(6):43-45.
- [13] Dash M, Chiellini F, Ottenbrite R M, et al. Chitosan-A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications[J]. *Prog Poly Sci*, 2011, 36(8):981-1014.
- [14] Renault F, Sancey B, Badot P M, et al. Chitosan for coagulation/flocculation processes-An eco-friendly approach[J]. *Eur Polym J*, 2009, 45(5):1337-1348.
- [15] 黄木土,彭雪,罗新根. 壳聚糖对板蓝根水提取液的絮凝工艺考察[J]. *中国药师*, 2012, 15(5):664-667.

[责任编辑 刘德文]