

## 壳聚糖粒子对小檗碱在体肠吸收的影响

侯子言, 焦放, 杨晔\*, 尹登科

(安徽中医药大学药学院, 安徽省中药制剂工程技术研究中心, 合肥 230012)

**[摘要]** **目的:**模拟中药汤剂微粒体系,探讨不同粒径的壳聚糖粒子(CS-Ps)对中药活性成分小檗碱在体肠吸收特性的影响。**方法:**采用高压静电喷雾法制备不同粒径壳聚糖粒子,检测粒子粒径与Zeta电位。利用在体肠灌注模型考察壳聚糖粒子粒径特征对小檗碱肠吸收速率常数及表观渗透系数的影响。**结果:**CS-P<sub>1</sub>, CS-P<sub>2</sub>, CS-P<sub>3</sub> 粒径分别为(163.9 ± 2.3), (456.0 ± 76.6), (903.4 ± 131.1) nm, Zeta 电位依次为(25.2 ± 7.0), (27.9 ± 4.3), (28.4 ± 5.7) mV, 各组粒子间表面电位无显著性差异。与空白组比较,CS-P<sub>1</sub> 和 CS-P<sub>2</sub> 组粒子对小檗碱肠吸收具有显著的促进作用( $P < 0.05$ ), CS-P<sub>3</sub> 组则无显著的促进作用。**结论:**壳聚糖粒子对小檗碱肠吸收具有促进作用,这种吸收促进作用与壳聚糖粒子的粒径相关。

**[关键词]** 壳聚糖; 粒子; 高压静电喷雾法; 小檗碱; 在体肠吸收

**[中图分类号]** R283.6; R945; R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)10-0011-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2016100011

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160331.1441.012.html>

**[网络出版时间]** 2016-03-31 14:41

## Effect of Chitosan Particles on Absorption of Berberine by *in situ* Intestinal Perfusion

HOU Zi-yan, JIAO Fang, YANG Ye\*, YIN Deng-ke

(Anhui Engineering Research Center for Chinese Medicine Preparation, College of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China)

**[Abstract]** **Objective:** To simulate particle system of traditional Chinese medicine decoction and to investigate effect of chitosan particles (CS-Ps) with different size on *in situ* intestinal absorption properties of berberine. **Method:** Chitosan particles with different particle size were prepared by high-voltage electrostatic spray method, its particle size and Zeta potential were evaluated by laser granularity analyzer. Intestinal absorption rate constant ( $K_a$ ) and average apparent permeability ( $P_{app}$ ) of berberine were assayed by *in situ* intestinal perfusion model. **Result:** Particlesizes of CS-P<sub>1</sub>, CS-P<sub>2</sub>, and CS-P<sub>3</sub> were (163.9 ± 2.3), (456.0 ± 76.6), (903.4 ± 131.1) nm, Zeta potentials of them were (25.2 ± 7.0), (27.9 ± 4.3), (28.4 ± 5.7) mV, respectively. There was no significant difference of surfacepotential value between different groups. Compared with the blank group, particlesize of CS-P<sub>1</sub> and CS-P<sub>2</sub> could promote intestinal absorption of berberine significantly ( $P < 0.05$ ); however, CS-P<sub>3</sub> group had no significant effect. **Conclusion:** Chitosan particles can promote intestinal absorption of berberine, which associated with its particle size.

**[Key words]** chitosan; particles; high-voltage electrostatic spray method; berberine; *in situ* intestinal absorption

**[收稿日期]** 20151018(014)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81303239)

**[第一作者]** 侯子言,在读硕士,从事中药新剂型研究,Tel:0551-68129126,E-mail:1192322420@qq.com

**[通讯作者]** \*杨晔,博士,副教授,从事中药新剂型研究,Tel:0551-68129126,E-mail:gnayye@126.com

小檗碱又称黄连素,是黄连的主要活性成分之一。近年来研究表明小檗碱具有抗炎、抗氧化、降血糖等药理作用<sup>[1]</sup>,但其肠吸收表观渗透系数( $P_{app}$ )介于  $3 \times 10^{-6} \sim 2 \times 10^{-5} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ ,属于肠道难吸收性药物,同时又是 P-糖蛋白(P-gp)底物,口服吸收生物利用度低,大大限制了小檗碱的临床应用<sup>[2]</sup>。而肌肉注射或者静脉滴注给药则不方便,且更易引起过敏性休克、药疹等不良反应<sup>[3]</sup>。

汤剂是应用最广泛的中药剂型,很多理论上口服难以吸收的中药活性成分以汤剂形式给药往往生物利用度较高<sup>[4]</sup>。小檗碱在汤剂如黄连解毒汤<sup>[5]</sup>等中的生物利用度能得以显著改善,这一现象与煎煮过程中形成的多分散体系及生理共溶性相关,但中药在煎煮过程中也会形成不同的微粒体系如多糖、蛋白等,然而这些微粒对有效成分吸收的影响尚不清楚。

壳聚糖是一种无毒、无刺激性、生物相容性好、可降解的天然碱性高分子多糖<sup>[6]</sup>。壳聚糖纳米粒是一种新型的药物载体,其不仅具备壳聚糖本身的特性如黏性、带正电荷等,还具有改变给药途径,提高药物的稳定性、吸收率、生物利用度,降低药物的毒性等特点。本实验以不同粒径的壳聚糖粒子模拟中药汤剂中微粒,研究不同粒径壳聚糖粒子对小檗碱肠吸收的影响,为小檗碱的制剂开发提供参考。

## 1 材料

UV757CRT 型紫外分光光度计(上海精密科学仪器有限公司),HL-1 型恒流泵(上海青浦沪西仪器厂),LSP01-1A 型微量推进仪(保定兰格恒流泵有限公司),ZEN3690 型激光散射粒度仪(英国 Malvern 公司),DW-P303-1ACF0 型高压直流电源(天津市东文高压电源厂),DF-101B 型集热式恒温加热磁力搅拌器(巩义市英峪予华仪器厂)。小檗碱对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号 WS0928KA13),小檗碱原料药(英达试剂有限公司,纯度 > 98%),壳聚糖(南通兴成生物制品厂,黏度  $200 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ ),D-葡萄糖(国药集团化学试剂有限公司),试剂均为分析纯。

健康 SD 大鼠,雄性,体重  $(200 \pm 20) \text{ g}$ ,由安徽医科大学实验动物中心提供,合格证号 SCXK(皖)2011-002。

## 2 方法与结果

### 2.1 标准曲线的绘制

**2.1.1 壳聚糖含量测定<sup>[7]</sup>** 准确称取壳聚糖  $30.0 \text{ mg}$ 溶于  $10.0 \text{ mL}$ 的 1% 乙酸水溶液中,配成

$3.00 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 壳聚糖母液,加 1% 乙酸水溶液稀释成  $2.0, 4.0, 8.0, 16.0, 32.0, 64.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的系列质量浓度溶液。取茜素红-乙酸缓冲液( $0.362 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH 4.5)6 份,每份  $1.0 \text{ mL}$ ,分别与上述系列质量浓度壳聚糖溶液  $1.0 \text{ mL}$ 混合均匀,反应 5 min 后补足水至  $5.0 \text{ mL}$ ,混匀,采用紫外分光光度计在  $426 \text{ nm}$ 处测定吸光度  $A$ 。以  $A$  对质量浓度( $C$ )进行线性回归,得回归方程  $A = -0.001 1C + 1.210 5 (r = 0.996 9)$ ,线性范围  $2.0 \sim 64.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

**2.1.2 小檗碱含量测定** 称取  $\text{NaCl } 1.950 \text{ g}$ ,  $\text{KCl } 0.088 \text{ g}$ ,  $\text{NaHCO}_3 0.343 \text{ g}$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 0.080 \text{ g}$ ,  $\text{MgCl}_2 0.005 \text{ g}$ , D-葡萄糖  $0.350 \text{ g}$ 溶于适量水中配制成 A 液;另称取  $\text{CaCl}_2 0.350 \text{ g}$ 溶解于适量水中配成 B 液;将 B 液与 A 液混合并加水定容至  $250 \text{ mL}$ 配制成 K 氏液<sup>[8]</sup>。精密称取小檗碱对照品  $1.00 \text{ mg}$ ,用 K 氏液配成  $64.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 母液,加水稀释成质量浓度  $2.0, 4.0, 8.0, 16.0, 32.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液,采用紫外分光光度法于  $345 \text{ nm}$ 处测定  $A$ 。以小檗碱  $C$  为横坐标,  $A$  为纵坐标,得回归方程  $A = 0.057 3C - 0.016 7 (r = 0.999 6)$ ,线性范围  $2.0 \sim 32.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

### 2.2 壳聚糖粒子的制备

**2.2.1 CS-Ps 制备<sup>[9-10]</sup>** 称取一定量壳聚糖溶于 1% 乙酸水溶液中,配制壳聚糖质量浓度分别为  $3.0, 3.0, 10.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 壳聚糖-乙酸溶液,完全溶解后,加入 2.4 倍量乙醇,搅拌至均一后装入高压静电喷雾装置,以水为接收液,接收装置距离喷头  $10 \text{ cm}$ ,微量推进器流速  $1.5 \text{ mL} \cdot \text{h}^{-1}$ ,针头与接收装置间分别施加静电电压  $14.0, 8.0, 8.5 \text{ kV}$ ,依次获得壳聚糖粒子 CS-P<sub>1</sub>, CS-P<sub>2</sub>, CS-P<sub>3</sub>。

**2.2.2 CS-Ps 表征** 采用激光散射粒度仪评价壳聚糖粒子粒径和 Zeta 电位。取一定量接收液,加入乙酸使壳聚糖完全溶解,按 2.1.1 项下方法检测并计算接收液中壳聚糖浓度。结果 CS-P<sub>1</sub>, CS-P<sub>2</sub>, CS-P<sub>3</sub> 粒径均一,粒径分别为  $(163.9 \pm 2.3)$ ,  $(456.0 \pm 76.6)$ ,  $(903.4 \pm 131.1) \text{ nm}$ , Zeta 电位依次为  $(25.2 \pm 7.0)$ ,  $(27.9 \pm 4.3)$ ,  $(28.4 \pm 5.7) \text{ mV}$ 。各组粒子间表面电位无显著性差异。

### 2.3 在体肠吸收试验

**2.3.1 灌注液配制** 以 K 氏液分散各组 CS-Ps,调节粒子质量浓度  $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,加入小檗碱原料药至质量浓度  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。空白组以 K 氏液配制的  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 小檗碱溶液作为灌注液。

**2.3.2 在体肠灌注实验<sup>[11]</sup>** 取禁食 12 h(可自由

饮水) SD 大鼠, 称重后按  $4.0 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉, 固定后沿腹中线打开一个  $2 \sim 3 \text{ cm}$  切口, 分离长度约  $10 \text{ cm}$  回肠, 两端切口插入橡胶管并结扎, 腹部覆盖浸有生理盐水脱脂棉保湿, 用预热至  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  生理盐水将肠内容物冲洗干净。更换灌流液, 以  $2.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  流速灌注  $15 \text{ min}$  (消除试验中管路对药物吸附的影响) 后记为  $0 \text{ h}$ , 以排空气法排空肠腔内灌流液, 取灌流液  $1.0 \text{ mL}$  测定小檗碱初始质量浓度, 并读取初始灌流液总体积  $V_i$ , 调节蠕动泵流速至  $0.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , 每  $15 \text{ min}$  取灌流液  $1.0 \text{ mL}$ ,  $60 \text{ min}$  后结束肠灌注, 量取循环结束时灌流液总体积  $V_f$ , 并剪下该肠段测量长度和内径。按 2.1.2 项下方法测量各时间点灌流液中小檗碱含量, 计算各时间点小檗碱吸收速率常数 ( $K_a$ ) 与表观渗透系数 ( $P_{\text{app}}$ )<sup>[12-13]</sup>。

$$q_w = (V_f - V_i) / t_e$$

$$V_f = V_i + q_w \cdot t$$

$$K_a = \frac{Q}{\pi r^2 l} \cdot \left(1 - \frac{C_{\text{out}} V_{\text{out}}}{C_{\text{in}} V_{\text{in}}}\right)$$

$$P_{\text{app}} = -\frac{Q}{2\pi r l} \cdot \ln \frac{C_{\text{out}} V_{\text{out}}}{C_{\text{in}} V_{\text{in}}}$$

式中  $q_w$  为单位时间内水的吸收量,  $V_i$  为循环灌流初始灌流液总体积,  $V_f$  为循环灌流结束灌流液总体积,  $t_e$  为灌流总有效时间,  $V_i$  为各时间点灌流结束灌流液体积,  $t$  为循环灌流有效时间,  $V_{\text{in}}$  和  $V_{\text{out}}$  分别为各时间点循环前后灌流液体积,  $Q$  为循环灌流流速,  $C_{\text{in}}$  和  $C_{\text{out}}$  分别为各时间点循环前后灌流液中小檗碱质量浓度,  $l$  和  $r$  分别为灌流肠段的长度和横截面半径。试验数据采用 SPSS 17.0 软件处理, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 2 组平均数间采用  $t$  检验比较,  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。结果表明 CS-P<sub>1</sub>, CS-P<sub>2</sub> 组小檗碱肠吸收平均  $K_a$  及  $P_{\text{app}}$  均显著高于空白组, CS-P<sub>3</sub> 组平均  $K_a$  及  $P_{\text{app}}$  与空白组间则无显著性差异。说明 CS-Ps 能改善小檗碱肠壁透过性, 提高小檗碱肠吸收。见表 1。

表 1 CS-Ps 粒径特征对小檗碱肠吸收特性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 1 Effect of chitosan particles on intestinal absorption of berberine ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	$K_a \times 10^{-4} / \text{min}^{-1}$	$P_{\text{app}} \times 10^{-5} / \text{cm} \cdot \text{min}^{-1}$
空白	$7.74 \pm 0.40$	$6.38 \pm 0.40$
CS-P <sub>1</sub>	$11.36 \pm 0.61^{1)}$	$10.30 \pm 1.08^{1)}$
CS-P <sub>2</sub>	$11.73 \pm 0.92^{1)}$	$10.00 \pm 0.12^{1)}$
CS-P <sub>3</sub>	$7.68 \pm 1.94$	$6.92 \pm 0.39$

注: 与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ 。

2.3.3 CS-Ps 对小檗碱吸附率 以 K 氏液分散 CS-P<sub>1</sub> 与 CS-P<sub>2</sub>, 调节粒子质量浓度  $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 加入小檗碱原料药至质量浓度  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 摇匀, 于  $5 \text{ 万} \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心  $20 \text{ min}$ , 取上清液按 2.1.2 项下方法测定小檗碱含量, 平行 3 组, 计算壳聚糖粒子对小檗碱吸附率分别为  $(0.43 \pm 0.02)\%$  与  $(1.07 \pm 0.05)\%$ , 吸附量依次为  $(0.45 \pm 0.01)\%$  与  $(1.14 \pm 0.04)\%$ 。表明有极少量的小檗碱吸附于 CS-Ps。

$$\text{吸附率} = \frac{\text{壳聚糖粒子吸附的小檗碱质量}}{\text{小檗碱总质量}} \times 100\%$$

$$\text{吸附量} = \frac{\text{壳聚糖粒子吸附的小檗碱质量}}{\text{壳聚糖粒子总质量}} \times 100\%$$

### 3 讨论

汤剂具有吸收快、发挥药效迅速、随证加减等优点<sup>[14]</sup>, 但其作为成分复杂的液体制剂, 其疗效的发挥不仅受组方方法、剂量等因素的影响, 同时还与煎煮过程中形成的固体微粒有关<sup>[15]</sup>, 针对这一现象, 本文通过 CS-Ps 模拟汤剂中的多糖粒子体系, 在小檗碱灌流液中加入不同粒径的 CS-Ps 进行在体肠循环, 评价和分析粒子的粒径特征对小檗碱肠吸收特性的影响。

本文研究结果表明具有不同粒径及相近表面电位的 CS-Ps 均可在不同程度上促进小檗碱的肠吸收作用。与空白组相比, 粒径  $< 500 \text{ nm}$  的粒子具有显著促吸收作用; 粒径  $> 500 \text{ nm}$  粒子促吸收作用不显著。粒子吸附率试验表明 CS-Ps 与小檗碱并不是完全独立存在的, 有极少量的小檗碱吸附于粒子形成复合物。说明 CS-Ps 的促吸收可能存在一个与粒径相关的阈值, 在该阈值内粒子的促吸收作用最为突出。其作用机制可能与 3 个方面有关: ① 粒子黏附性。壳聚糖粒子具有与壳聚糖分子相同的黏性, 能够增加灌流液的黏度, 延长药物在胃肠道的滞留时间, 从而促进药物扩散吸收<sup>[16]</sup>。② 打开紧密连接。小檗碱是一种亲脂性药物, 主要通过被动扩散吸收, 而难以透过紧密连接进入血液循环; 但带有正电位的 CS-Ps 能够穿过黏液层, 与带有负电位的紧密连接蛋白如肌动蛋白, ZO-1 蛋白等发生静电作用, 造成紧密连接蛋白解散或缺失, 允许亲脂性药物通过紧密连接进入固有层, 提高药物的渗透吸收<sup>[16]</sup>。③ 细胞摄取。对于粒径  $< 500 \text{ nm}$  的粒子主要通过细胞吞噬作用进入淋巴细胞; 小檗碱与粒子形成复合物后, 可随细胞摄取途径进入淋巴循环<sup>[16]</sup>。由于汤剂在煎煮过程中会形成大量粒子, 这些粒子的特性存在很大的差异, 但粒子的粒径是最主要的差别之一。本文通过 CS-Ps 证明了粒径是影

响汤剂有效成分吸收的因素之一,但具体影响机制有待于进一步研究确认。

[参考文献]

[1] 宋珏,路通,刘晓东,等. 黄连解毒汤抗氧化作用的血清药理学研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(4):118-122.

[2] 张玉玲,陈健龙,王虑虎,等. 小檗碱的油水分系数及其在体肠循环灌流模型中的肠吸收特性[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(16):1-4.

[3] Zhang X F, Qiu F R, Jiang J, et al. Intestinal absorption mechanisms of berberine, palmatine, jateorhizine, and coptisine: involvement of P-glycoprotein [J]. *Xenobiotica*,2011,41(4):290-296.

[4] 刘瑞新,施钧瀚,张璐,等. 基于 HPLC,PCA 与相似度评价的芍药甘草汤传统汤剂与配方颗粒汤剂的差异规律分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(24):1-5.

[5] 谈聪,薛世姣,李博,等. 基于方证对应理论的黄连解毒汤肠道吸收分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(5):6-10.

[6] Yeh T H, Hsu L W, Tseng M T, et al. Mechanism and consequence of chitosan-mediated reversible epithelial tight junction opening[J]. *Biomaterials*,2011,32(26):6164-6173.

[7] 高贵珍,刘小阳. 分光光度法测定壳聚糖含量适宜条件的研究[J]. 安庆师范学院学报:自然科学版,2010,16(2):102-105.

[8] 陈晓萌,张迎春,林朔,等. 外翻肠囊法发现元胡止

痛片吸收成分群的研究[J]. 中国中药杂志,2012,37(13):2005-2010.

[9] Trotta M, Cavalli R, Trotta C, et al. Electrospray technique for solid lipid-based particle production[J]. *Drug Dev Ind Pharm*,2010,36(4):431-438.

[10] Nie H M, Fu Y L, Wang C H. Paclitaxel and suramin-loaded core/shell microspheres in the treatment of brain tumors[J]. *Biomaterials*,2010,31(33):8732-8740.

[11] 张玉玲,陈健龙,王虑虎,等. 小檗碱的油水分系数及其在体肠循环灌流模型中的肠吸收特性[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(16):1-4.

[12] Mario G, Giancarlo C. Theoretical considerations on the *in vivo* intestinal permeability determination by means of the single pass and recirculating techniques [J]. *Int J Pharm*,2001,229(1/2):95-105.

[13] Zhou Y, Jiao Y, Wei Y H, et al. Effects of pyridoxine on the intestinal absorption and pharmacokinetics of isoniazid in rats[J]. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*,2013,38(1):5-13.

[14] 林渊,周良良,吴水生. 对中药汤剂剂型改革研究的思考[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(5):264-266.

[15] 杨晔,尹登科,蔡汉须,等. 黄芩水煎液中固体微粒对活性成分吸收的调节作用研究[J]. 中药材,2014,73(3):896-898.

[16] Dhawan S, Singla A K, Sinha V R. Evaluation of mucoadhesive properties of chitosan microspheres prepared by different methods [J]. *AAPS Pharm Sci Tech*,2014,5(4):e67.

[责任编辑 刘德文]