

盐酸小檗碱粉雾剂的制备及其对金黄色葡萄球菌肺炎的作用研究

孟治平, 路曼琪, 苏文强, 陈轩宇, 经杰, 韩星星, 邓小敏, 梁银妹, 付廷明*, 冯鹏*

南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023

摘要: 目的 制备盐酸小檗碱粉雾剂, 肺部给药后考察其对于金黄色葡萄球菌肺炎的药效作用。方法 通过正交试验优化喷雾干燥条件, 制备盐酸小檗碱粉雾剂; 对其肺部沉积、流动性、外观形态进行研究; 并评价该制剂对金黄色葡萄球菌肺炎大鼠的药效作用。结果 最终确定在 130 °C 的进口温度、610 L/h 的气体体积流量下, 以 3 mL/min 的进料体积流量, 通过喷雾干燥制备盐酸小檗碱粉雾剂。盐酸小檗碱粉雾剂肺部沉积率 (FPF) 76.4%, 空气动力学直径为 4.61 μm 。稳定指数 (SI) ≈ 1 , 充气能比 (AR) = 1.76 > 1, 充气能量 (AE₁₀) = 2.1 mJ < 10 mJ。对金黄色葡萄球菌的药效学评价, 表面盐酸小檗碱粉雾剂可以有效改善肺炎大鼠的病理状态, 显著降低肺炎大鼠白细胞、中性粒细胞的数量 ($P < 0.05$), 以及炎症因子 (TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6) 的水平。结论 盐酸小檗碱粉雾剂通过肺部给药可以直达病变部位, 对金黄色葡萄球菌肺炎具有显著的治疗作用。

关键词: 盐酸小檗碱; 金黄色葡萄球菌; 肺炎; 粉雾剂; 肺部给药; 喷雾干燥; 肺部沉积; 稳定指数; 充气能比; 充气能量
中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)02-0348-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.02.010

Preparation of berberine hydrochloride dry powder inhalation and its effect on *Staphylococcus aureus* pneumonia

MENG Zhi-ping, LU Man-qi, SU Wen-qiang, CHEN Xuan-yu, JING Jie, HAN Xing-xing, DENG Xiao-min, LIANG Yin-mei, FU Ting-ming, FENG Peng

School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

Abstract: Objective To prepare berberine hydrochloride dry powder inhalation, and investigate its pharmacological effect on *Staphylococcus aureus* pneumonia after pulmonary administration. **Methods** Berberine hydrochloride dry powder by spray drying and the experimental conditions was optimized by orthogonal experiment. The lung deposition, fluidity and appearance were characterized. The pharmacodynamic effects of the preparations on *S. aureus* pneumonia were performed with SD rats. **Results** A berberine hydrochloride dry powder was prepared at an inlet temperature of 130 °C with a gas volume flow of 610 L/h and a feed volume flow of 3 mL/min. The berberine hydrochloride dry powder had a lung deposition rate (FPF) of 76.4% and an aerodynamic diameter of 4.61 μm . The stability index (SI) ≈ 1 , the aeration energy ratio (AR) = 1.76 > 1, and the inflation energy (AE₁₀) = 2.1 mJ < 10 mJ. Through the pharmacodynamic evaluation of *S. aureus*, we can know that the berberine hydrochloride dry powder inhalation effectively improved the pathological state of pneumonia rats, and significantly reduced ($P < 0.05$) the number of WBC, neutrophils, and the expression of inflammatory factors (TNF- α , IL-1 β , and IL-6) in pneumonia rats. **Conclusion** Berberine hydrochloride dry powder inhalation can directly reach the lesion site through pulmonary administration, so it has significant therapeutic effect on *S. aureus* pneumonia.

Key words: berberine hydrochloride; *Staphylococcus aureus*; pneumonia; dry powder inhalation; pulmonary administration; spray drying; pulmonary deposition; stability index; aeration ratio; aerated energy

细菌性肺炎是由细菌侵入下呼吸道而引起的肺部感染, 是全世界儿童死亡的主要原因, 占 5 岁以下儿童死亡总数的 5%^[1]。而金黄色葡萄球菌为引起细菌性肺炎最常见的病原体^[2]。临床上细菌性肺炎

收稿日期: 2019-08-26

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81873013)

作者简介: 孟治平, 男, 硕士研究生。E-mail: 13022581287@163.com

*通信作者 付廷明, 男, 硕士生导师, 副教授, 研究方向为药物颗粒与吸入给药技术。E-mail: futm@njucm.edu.cn

冯鹏, 男, 硕士生导师, 教授, 从事中药现代化研究。E-mail: 21126989@qq.com

的治疗药物主要为抗生素^[3],但是由于抗生素药物的长时间使用,使得细菌耐药性不断增强,药物治疗效果不断下降^[4]。肺部给药相比于常规的给药方法有其独特的优势,比如,肺部比表面积较大,毛细血管丰富,可以有效吸收药物^[5-6],还可以避免肝脏的首关效应。在治疗肺部疾病时,肺部给药可以直接将药物输送至病变部位,增加药物浓度,并减少药物在其他器官的分布,达到减毒增效的效果^[7]。

小檗碱(berberine, Ber)是从黄连中提取的一种季苄基异喹啉类生物碱,有悠久的历史^[8]。在临床上 Ber 常以盐酸盐形式的盐酸小檗碱(BH)被应用,根据相关研究, BH 具有较强的广谱抗菌能力^[9-14],并且具有抗炎^[15-16]、抗肿瘤^[17-19]、抗糖尿病^[20]、神经元保护^[21]、调脂^[22]等功效。但是由于其口服生物利用率极低^[23],所以严重限制了其药效作用。针对这个问题,本课题组通过喷雾干燥将 BH 制成可直接肺部给药的制剂,通过肺部给药使药物直接作用于感染部位,增加其药效,达到有效治疗金黄色葡萄球菌肺炎的目的。

1 仪器与材料

1.1 仪器

MS-105 型十万分之一电子天平,瑞士梅特勒公司;EPED-E2-20TS 型实验室级超纯水器,南京易普易达科技发展有限公司;超声波清洗仪,南京科尔仪器设备有限公司;DHG-9023A 型电热恒温鼓风干燥箱,上海精宏实验设备有限公司;BX53 型生物显微镜,日本 Olympus Corporation 公司;HY-45 气浴恒温摇床,常州国宇仪器制造有限公司;TU-1810 紫外可见分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司;BuchiB-290 喷雾干燥仪,瑞士步琦有限公司;NT 球磨机,琅菱机械有限公司;85-1 型磁力搅拌器,南京文尔仪器有限公司;Freeman FT4 Rheometer 粉末流变仪,英国 Freeman Technology 公司;安德森撞击器,常州康华仪器制造厂。

1.2 药品与试剂

BH,批号 20160228,质量分数>98%,南京良纬生物科技有限公司;BH 对照品,质量分数≥99%,批号 110713-201814,中国食品药品检定研究院;青霉素钠(质量分数>98%)、环孢菌素 A(质量分数>98%),上海源叶生物科技有限公司;4%多聚甲醛固定液,批号 1808575, Biosharp 公司;大鼠肿瘤坏死因子- α (TNF- α) ELISA 试剂盒(批号

201905)、大鼠白细胞介素-1 β (IL-1 β) ELISA 试剂盒(批号 201905)、大鼠 IL-6 ELISA 试剂盒(批号 201905),南京翼飞雪科技有限公司。

1.3 动物

SPF 级健康雄性 SD 大鼠,南京市江宁区青龙山实验动物中心,质量 180~200 g,许可证号 SYXK(苏)2017-0001,合格证编号 NO. 201906865。

1.4 菌种

金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 标准菌株,北京索莱宝科技有限公司。

2 方法与结果

2.1 BH 的测定方法

精密称取 5 mg BH 对照品于 50 mL 量中,用甲醇溶解并定容,得到 100 μ g/mL 的母液。将母液用甲醇稀释得到 0.4、2.4、4.4、6.4、8.4、10.4 μ g/mL 的 BH 对照品溶液。用紫外分光光度计在 345 nm 下测定吸光度(A)值,以质量浓度对 A 值做线性回归,绘制标准曲线,得回归方程为 $Y=0.012\ 5\ X-0.000\ 1$, $r^2=0.998\ 9$,结果表明 BH 在 0.4~10.4 μ g/mL 线性关系良好。

2.2 BH 粉雾剂制备

称取一定量的 BH,于水中在球磨机中球磨 3 h,取出,用水稀释至适当浓度,放置于磁力搅拌器上搅拌并喷雾干燥。喷雾干燥条件如下:进口温度 100~140 $^{\circ}$ C,气体体积流量 370~610 L/h,进料体积流量 3~6 mL/min。

2.3 BH 喷雾干燥条件优化

2.3.1 进口温度的单因素考察 以 500 L/h 的气体体积流量,3 mL/min 的进料体积流量以及 100、120、140 $^{\circ}$ C 的进口温度分别去喷雾干燥 BH 溶液。结果收率分别为 36%、44.2%、40.5%,颗粒的肺部沉积率(FPF)分别为 35.8%、56%、50.7%。120 $^{\circ}$ C 时喷雾干燥的收率以及所得微粒肺部沉积率最高,因此后续实验选择 120 $^{\circ}$ C 的进口温度为考察参数之一。

2.3.2 气体体积流量的单因素考察 以 120 $^{\circ}$ C 的进口温度,3 mL/min 的进料体积流量以及 370、500、610 L/h 的气体体积流量分别喷雾干燥 BH 溶液。结果收率分别为 42%、44%、51.8%,颗粒的 FPF 分别为 20.3%、39.9%、59%。后续实验选择 610 L/h 的气体体积流量为考察参数之一。

2.3.3 进料体积分流量的单因素考察 以 120 $^{\circ}$ C 的进口温度,610 L/h 的气体体积流量以及 3、4.5、6 mL/min 的进料体积分流量分别去喷雾干燥 BH 溶液。

结果收率分别为 50%、43%、22.5%，颗粒的 FPF 分别为 63.2%、36.8%、16%。随着进料体流量的增加，喷雾干燥的收率以及所得微粒肺部沉积率随之降低，因此后续实验将 3 mL/min 的进料体流量作为参数之一。

2.3.4 喷雾干燥条件优化的正交试验 根据单因素试验的考察结果，选择进口温度（A）、气体体流量

量（B）、进料体流量（C）3 个因素，按 $L_4(2^3)$ 正交表进行 3 因素 2 水平正交试验。以 FPF、收率的综合评分为指标，综合评分 = $FPF \times 0.6 + \text{收率} \times 0.4$ 。用综合评分值进行方差分析，最后筛选喷雾干燥最优条件并验证。正交试验安排及结果见表 1，方差分析结果见表 2。

由表 1 可知，在所考察的 3 个因素中，进口温

表 1 BH 粉雾剂喷雾干燥条件优化正交试验安排及结果

Table 1 Spray drying orthogonal experimental optimization design and results of BH dry powder inhalation

试验号	A/℃	B/(L·h ⁻¹)	C/(mL·min ⁻¹)	收率/%	FPF/%	综合评分
1	110 (1)	370 (1)	3 (1)	32.0	35.82	34.292
2	110 (1)	610 (2)	6 (2)	34.6	39.99	37.834
3	130 (2)	370 (1)	6 (2)	35.0	44.20	40.520
4	130 (2)	610 (2)	3 (1)	55.3	74.90	67.060
K_1	72.126	74.812	101.352			
K_2	107.580	104.894	78.354			
R	35.454	30.082	22.998			

表 2 BH 粉雾剂喷雾干燥正交试验方差分析

Table 2 Spray drying orthogonal experimental variance analysis of BH dry powder inhalation

误差来源	偏差平方和	自由度	F 值	显著性
A	314.1	1	2.37	无
B	226.1	1	1.71	无
C	132.3	1	1.00	无
误差	132.3	1		

度对实验考察指标影响最大，其次是气体体流量和进料体流量，即 $A > B > C$ 。表 2 的方差分析结果表明进口温度、气体体流量、进料体流量对实验均无显著性影响。结合正交试验及预试验结果，确定 BH 粉雾剂的最佳喷雾干燥条件为 $A_2B_2C_1$ 。再重复 3 次验证试验预测结果，由验证结果（表 3）可知，在最佳喷雾干燥条件下得到的 BH 粉雾剂综合评分 RSD 为 $1.62\% < 2\%$ ，说明此条件稳定可行。综上可得，最终在 130 ℃的进口温度、610 L/h 的气体体流量下，以 3 mL/min 的进料体流量制备得到 BH 粉雾剂。

表 3 验证试验结果 ($n = 3$)

Table 3 Results of verification test ($n = 3$)

试验次数	收率/%	FPF/%	综合评分
1	51.8	76.7	66.74
2	57.5	74.3	67.58
3	55.0	78.2	68.92

2.4 BH 粉雾剂性质评价

2.4.1 流动性测试 使用 FT4 多功能粉体流动性测试仪测定 BH 粉雾剂的稳定性和流动速率（stability and variable flow rate）、充气性（aeration）以及透气性（permeability）。

FT4 稳定性测试和变流动速率测定是叶片以固定或变化的速率穿过样品粉末，通过测量叶片所受阻力而评价样品流动性。经过 7 个相同条件的测试，如果粉末是稳定的，那么每次测量的结果应该是相似的。如图 1-A 所示 BH 粉雾剂稳定指数（SI） ≈ 1 ，而且曲线平滑，表明样品稳定性很好。如图 1-B 所示变流动速率测定显示流速指数（FRI） > 3 ，表明粉体黏性较大。

$$SI = \frac{\text{能量}_{\text{第 7 次测试}}}{\text{能量}_{\text{第 1 次测试}}}$$

$$FRI = \frac{\text{能量}_{\text{第 4 次测试}}}{\text{能量}_{\text{第 1 次测试}}}$$

粉体的充气性测试是通过从装有粉体的容器底座通入空气，测量流动能量的减少来量化粉体流动性质的改变而获得的。通常充气能比（AR）越大，充气能量（AE）越低，粉末的黏合性越小。如图 1-C 所示 BH 粉雾剂 $AR = 1.76 > 1$ ， AE_{10} （第 10 次测试的充气能量） $= 2.1 \text{ mJ} < 10 \text{ mJ}$ ，说明颗粒略有黏性，彼此之间的内聚力较低，在较小的充气流速下颗粒便可以呈流态化，因此只要有很小的气流便可以吸入肺部。

$$AR = \frac{\text{能量}_{\text{风速为 0}}}{\text{能量}_{\text{风速为 } n}}$$

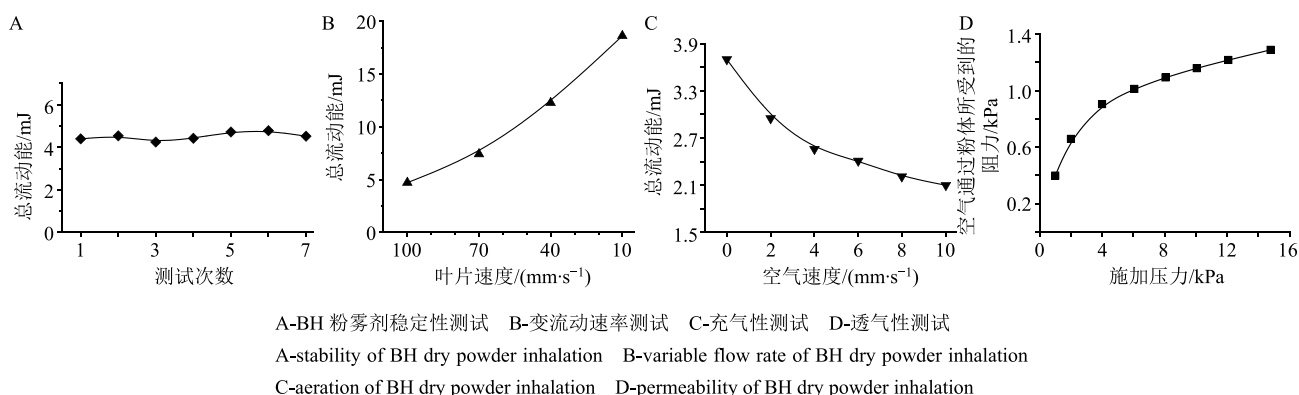


图 1 BH 粉雾剂流动性测试

Fig. 1 Fluidity test of BH dry powder inhalation

$AE_n = \text{能量}_{\text{风速为 } n}$

AE_n 为第 n 次测试的充气能量

透气性是衡量气体穿过粉体容易程度的指标。通过对粉体施加一定的压力，测量空气通过粉体所受到的阻力而定量。如图 1-D 所示，随着样品所受到的压力增加，空气通过样品内部所受到的阻力也随之增加，说明样品孔隙率降低，可用于空气通过的通道的尺寸和数量都在减少。所以 BH 粉雾剂具有中等透气性，空气较易通过粉末之间，有利于吸入。

2.4.2 BH 粉雾剂空气动力学性质考察 根据第四部《中国药典》使用安德森撞击器 (ACI) 测定 BH 粉雾剂的空气动力学特征。根据流动性测试结果可知 BH 粉雾剂具有黏性，为了防止其黏附于胶囊壳上影响实验的准确性，将粉体与 20 倍的壳聚糖用等量递增法过筛混合后进行实验。将 10 颗分别装有 5 mg 混合粉末的 3 号明胶胶囊置于吸乐装置 (HandiHaler®) 中，通过吸嘴适配器将其与人工喉连接，以 28.3 L/min 的气体体积流量测定。最后收集给药装置、人工喉、预分离器以及各个收集盘中的颗粒，用适量甲醇溶解各部分的粉末，用紫外分光光度计于 345 nm 下测定 A 值确定 BH 含量。按以下公式计算药物 FPF、排空率 (ED)。

$FPF = \text{收集盘第 2~7 级药物质量之和} / \text{人工喉部、给药装置及各级药物的总量}$

$ED = (\text{胶囊中粉末总质量} - \text{胶囊中残留的粉末质量}) / \text{胶囊中粉末总质量}$

如图 2 结果显示，BH 粉雾剂 FPF 为 76.4%，表明药物到达 ACI 装置 2 级及之后的效率较高，药物能够被更有效输送至肺内部。ED 为 97.4%，符合药典标准。通过 ACI 中值粒径 (MMAD) 计算器，算出 BH 粉雾剂空气动力学直径为 4.61 μm ，在 1~

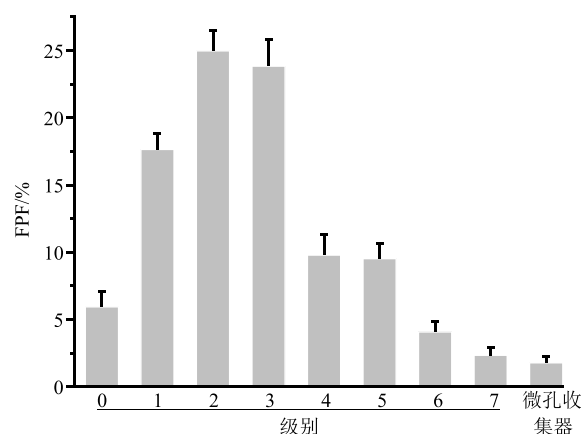


图 2 BH 粉雾剂肺部沉积

Fig. 2 Lung deposition of BH

5 μm ，说明药物可以到达肺部深处，满足肺部吸入制剂标准。

2.4.3 场发射扫描电镜 (SEM) 观察 取少量 BH 原料药以及喷雾干燥样品进行真空离子喷金后，用 SEM 进行观察并拍照。如图 3 显示，BH 原料药粉末为棱角分明的长条状 (图 3-A)。BH 粉雾剂粉末呈类球形或不规则形，大小不均一，表面略有褶皱 (图 3-B、C)。通过分析，这与喷雾干燥过程中喷嘴每次喷出的药物悬浊液浓度不均一有关^[24-25]。其中，浓度较低的部分喷干形成了这种较小的类球形形态，而药液质量浓度较高的部分在较高入口温度下，会导致液滴外表面水份迅速蒸发形成固体外壳，而内部还存在大量的水分，这将会形成很大的质量浓度差，随着蒸发过程的继续，固体外壳塌陷凹陷，便形成了这种较大的不规则形态。

2.5 药效实验

2.5.1 金黄色葡萄球菌悬液制备 取出金黄色葡萄球菌冻存液，解冻后于 TSB 平板培养基上划线，37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 24 h。挑取平板上的单个菌落于 10 mL

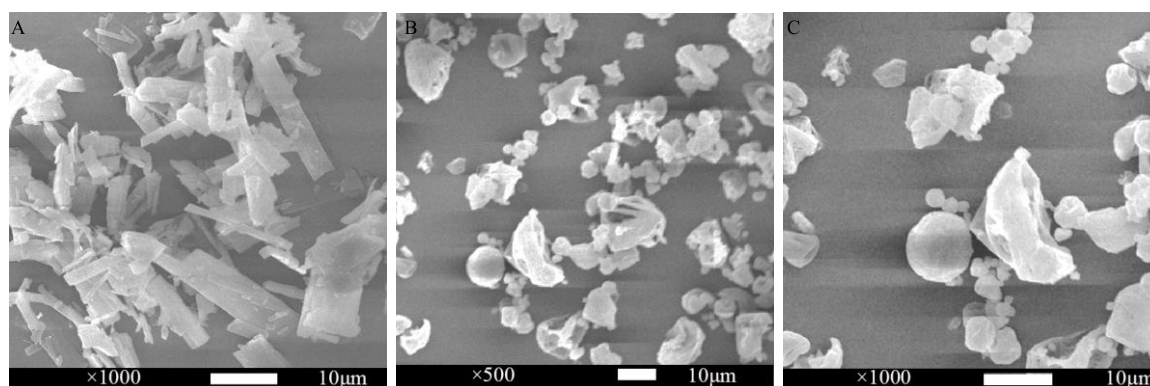


图 3 BH 粉末 ($\times 1\,000$, A) 和 BH 粉雾剂 ($\times 500$, B; $\times 1\,000$, C) 的扫描电镜图片

Fig. 3 SEM of BH powder ($\times 1\,000$, A) and BH dry powder inhalation ($\times 500$, B; $\times 1\,000$, C)

TSB 液体培养基中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 200 r/min 培养 15 h , 充分混匀, 取 $100\text{ }\mu\text{L}$ 转移至新的 TSB 液体培养基中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 200 r/min 继续培养 6 h 。 $1\,300\text{ r/min}$ 离心 15 min , 加无菌 PBS 离心洗涤 3 次后, 加 1 mL 无菌 PBS, 并用麦氏比浊法调细菌浓度至 $5\times 10^8\text{ CFU/mL}$ 。

2.5.2 分组及给药 选择雄性 SD 大鼠 60 只, 分为对照组、假手术组、模型组、BH 组、青霉素组, 实验之前使所有大鼠适应 7 d 。除对照组外, 其余各组实验前每天 1 次 ip 0.5 mg/kg 环孢菌素, 连续 3 d 。然后应用本课题组肺部给药方法^[26], 给模型组、BH 组、青霉素组每只大鼠肺部给予 0.2 mL ($5\times 10^8\text{ CFU/mL}$)^[27] 的金黄色葡萄球菌悬浮液来建立肺炎模型。接种 12 h 后治疗。对照组、假手术组及模型组每只大鼠肺部给予无菌生理盐水 (0.2 mL), BH 组每只大鼠肺部给予 BH 粉末 (12 mg/kg), 青霉素组每只大鼠肺部给予青霉素钠溶液 (48 mg/kg)。

2.5.3 白细胞和中性粒细胞检测 治疗 1 d 及 4 d 后, 戊巴比妥钠麻醉大鼠, 腹主动脉取血, 用自动血液分析仪分析测量大鼠全血中的白细胞和中性粒

细胞。

结果 (表 4) 表明, 与对照组和假手术组相比, 模型组大鼠全血中的白细胞 (WBC) 和中性粒细胞数目显著升高 ($P<0.05$)。与模型组相比, 治疗 4 d 后 BH 组和青霉素组白细胞和中性粒细胞数目显著降低 ($P<0.05$), 但是较对照组和假手术组有所上升, 这是由于大鼠给药后肺部受到异物刺激会促进炎症反应。BH 组与青霉素组的白细胞和中性粒细胞并无显著性差异 ($P<0.05$)。

2.5.4 肺组织病理学检查 将右肺用 4% 多聚甲醛溶液固定, 石蜡包埋, 切片, 用苏木精和曙红 (H&E) 染色, 并在光学显微镜下检查并拍照, 结果见图 4。

HE 染色显示, 对照组和假手术组大鼠肺组织结构清晰完整, 肺泡充盈, 数量丰富, 肺间质无充血以及水肿现象。模型组肺组织结构明显异常, 肺间质充血造成肺泡隔增厚, 肺泡萎陷缩小, 肺巨噬细胞等炎症细胞广泛分布于肺间质及肺泡隔中。肺炎模型经过 BH 或青霉素治疗 1 d 后, 肺组织结构病变情况有所改善, 肺间质以及肺泡隔充血较模型组减少, 局部肺泡逐渐恢复至正常大小。经 BH 治

表 4 BH 粉雾剂对金黄色葡萄球菌肺炎大鼠白细胞和中性粒细胞的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 4 Effects of BH dry powder inhalation on number of WBC and neutrophil in *S. aureus* pneumonic rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	第 1 天		第 4 天	
	白细胞数目/ $(\times 10^9\cdot\text{L}^{-1})$	中性粒细胞数目/ $(\times 10^9\cdot\text{L}^{-1})$	白细胞数目/ $(\times 10^9\cdot\text{L}^{-1})$	中性粒细胞数目/ $(\times 10^9\cdot\text{L}^{-1})$
对照	5.93 ± 0.29	1.43 ± 0.45	6.13 ± 2.61	1.40 ± 0.35
假手术	$5.73\pm 0.32^{\#}$	$1.27\pm 0.38^{\#}$	$5.80\pm 2.35^{\#}$	$1.27\pm 0.25^{\#}$
模型	$12.40\pm 0.87^*$	$3.53\pm 0.61^*$	$12.00\pm 0.61^*$	$3.43\pm 0.35^*$
BH	$8.90\pm 0.40^{*\#}$	$2.80\pm 0.44^*$	$8.37\pm 0.23^{\#}$	$2.37\pm 0.32^{*\#}$
青霉素	$8.53\pm 0.74^{*\#}$	$2.57\pm 0.60^{*\#}$	$7.07\pm 0.61^{\#}$	$2.27\pm 0.40^{*\#}$

与对照组比较: $^*P<0.05$; 与模型组比较: $^{\#}P<0.05$, 表 5 同

$^*P<0.05$ vs control group; $^{\#}P<0.05$ vs model group, same as table 5

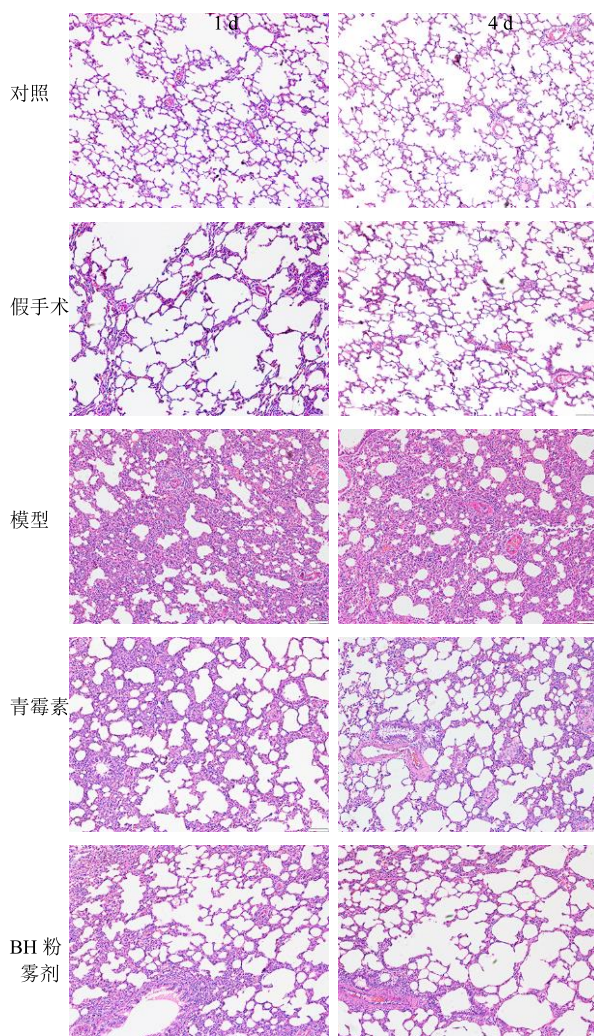


图 4 BH 粉雾剂对于肺炎大鼠肺部病理形态的影响 (HE 染色, $\times 100$)

Fig. 4 Effects of BH dry powder inhalation on histopathological changes in *S. aureus* pneumonic rats (staining with HE, $\times 100$)

疗 4 d 后, 肺间质充血情况基本消失, 肺泡隔较对照组只有略微的增厚, 肺泡大部分已经恢复至正常大小, 肺巨噬细胞数量明显减少。青霉素治疗 4 d 后, 肺部结构病变完全恢复, 较对照组无明显差异。

2.5.5 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 的检测 治疗 1 d 及 4 d 后, 处死大鼠, 解剖大鼠暴露肺及气管, 用止血夹夹住右肺, 在气管处开一小口, 插入剪掉针头的静脉输液针, 用生理盐水冲洗左肺, 每次 2 mL 冲洗 3 个循环。收集肺泡灌洗液 (BALF), 3 000 r/min 离心 15 min 后, 取上清置于 -80°C 保存。用 ELISA 试剂盒定量检测大鼠 BALF 中的 TNF- α 、IL-1 β 以及 IL-6。根据试剂盒说明书进行检测及计算, 结果见表 5。

与对照组和假手术组相比, 模型组大鼠 BALF 中的 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 显著升高 ($P < 0.05$)。与模型组相比, BH 和青霉素显著降低了大鼠 BALF 中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的产生 ($P < 0.05$), 并且 BH 组与青霉素组的 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 无显著性差异 ($P > 0.05$)。

实验结果表明, BH 能够显著抑制炎症因子的表达。假手术组大鼠炎症因子略低于对照组, 是因为假手术能够一定程度降低炎症因子表达, 与文献研究结果一致^[28]。由于肺部给药后会刺激炎症因子的表达, 治疗后的给药组炎症因子略高于对照组, 但无显著性差异 ($P > 0.05$)。

2.6 统计分析

所有数据结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用 SPSS 22 对结果进行统计学分析。组内比较用 t 检验, 组间比较用单因素方差分析。

表 5 BH 粉雾剂对金黄色葡萄球菌肺炎大鼠 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 5 Effects of BH dry powder inhalation on TNF- α , IL-1 β , and IL-6 in *S. aureus* pneumonic rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	第 1 天			第 4 天		
	TNF- α /(ng·L ⁻¹)	IL-1 β /(ng·L ⁻¹)	IL-6/(ng·L ⁻¹)	TNF- α /(ng·L ⁻¹)	IL-1 β /(ng·L ⁻¹)	IL-6/(ng·L ⁻¹)
对照	239.98 $\pm$ 22.22	26.51 $\pm$ 1.01	119.13 $\pm$ 11.89	231.47 $\pm$ 24.88	28.86 $\pm$ 1.32	116.24 $\pm$ 10.01
假手术	231.47 $\pm$ 12.44 [#]	26.15 $\pm$ 0.56 [#]	113.55 $\pm$ 11.22 [#]	228.79 $\pm$ 31.76 [#]	26.35 $\pm$ 0.34 [#]	113.96 $\pm$ 15.78 [#]
模型	360.42 $\pm$ 0.67 [*]	44.89 $\pm$ 2.83 [*]	167.86 $\pm$ 4.70 [*]	349.00 $\pm$ 5.07 [*]	43.18 $\pm$ 2.24 [*]	169.72 $\pm$ 1.89 [*]
BH	291.02 $\pm$ 24.99 [#]	32.94 $\pm$ 4.31 [#]	125.86 $\pm$ 8.27 [#]	255.43 $\pm$ 26.12 [#]	33.11 $\pm$ 4.66 [#]	121.62 $\pm$ 15.67 [#]
青霉素	292.81 $\pm$ 17.97 [#]	30.90 $\pm$ 2.00 [#]	124.72 $\pm$ 12.10 [#]	258.79 $\pm$ 26.41 [#]	32.25 $\pm$ 7.37 [#]	120.79 $\pm$ 6.05 [#]

3 讨论

喷雾干燥的工艺参数对于最终得到的 BH 粉雾剂的药物性能密切相关, 比如粉雾剂的空气动力学性质、外观形态、流动性、黏性以及粒径等。本实

验选择药物 FPF 为考察药物性能的第一指标, 因为药物 FPF 可以直观反映药物空气动力学粒径介于 1~5 μm , 是反映粉雾剂剂型成功与否的重要参数。考虑到制备粉雾剂的效率及成本, 收率被选择作为

本实验考察的第 2 指标。因为进口温度、气体流速、进样速度在喷雾干燥过程中可直接调节,而且预计也会对制剂产生最大影响^[29],所以选择考察这 3 个因素对制剂的影响,从而选择最优的喷雾干燥条件。

进口温度对喷雾干燥过程中的热量和质量传递有直接影响,当进口温度较低时由于干燥的更慢,水分含量会更高,而且会产生一些大的聚集体,因此所得颗粒药物 FPF 较高。气体流速选择对于最终得到颗粒的尺寸、密度等性质至关重要,较高的气体流速会使得更有可能克服液体表面能而产生更小的液滴,得到粒径更小的干燥颗粒,因此,在较高气体体积流量下 1~5 μm 的颗粒百分比会增加。进料速度控制进入干燥室的溶剂和固体的含量,在高进料速度下,干燥室内的液体蒸发量较多,从而降低了喷雾干燥玻璃器皿内的温度,而较低的温度会降低颗粒的自由流动使颗粒黏附于器壁之上,降低粉末产量。而且在相同的气体体积流量下,药物的进料速度增加会导致雾化能量不足而产生较大液滴,得到产物粒径更大。

用 FT4 进行粉体变流动速率测试时 BH 粉雾剂 FRI 较大,一般情况下, $\text{FRI} > 3$ 时通常表明粉末黏性很大,但是,这与透气性、充气性测试结果不符,透气性、充气性测试显示粉体只有略微黏性。结合扫描电镜结果以及变流动速率的测试的特殊过程,测试叶片在低速转动时,粉体变得更加凝结,空气被挤压出去,随着测试叶片的继续转动,该凝结区域在叶片前方进一步延伸,使得消耗的总能量相应地更高。而且粉体在低流速下,相邻的不规则颗粒紧密结合在一起,更可能会发生颗粒互锁现象,也会导致消耗总能量的升高。但是在高体积流量下,粉体间夹带的空气更多,而空气可以起到润滑剂的作用,减少颗粒间的摩擦,较高的流速也会使得颗粒相对速度较大,颗粒互锁效应不太可能发生,这些都会减少产生流动所需要的能量。综上所述,低体积流量下能量的升高以及高体积流量下的能量降低便导致了 BH 粉雾剂 FRI 值偏高。

与原料药相比,经过喷雾干燥后的微粒粒径更小,外观也更加规则,研究证明这可以明显提高药物的生物利用度^[30-31]。此外吸入给药相较于传统的口服给药,由于其特殊的给药方式及肺部结构,药物可以有效避免首关效应,并可以增加药物在肺部的溶解及渗透^[32]。因此喷雾干燥后吸入给药可以有效提高 BH 的生物利用度。

BH 粉雾剂空气动力学直径介于 1~5 μm ,虽然符合吸入粉雾剂的制剂标准,但是结合扫描电镜结果,粉体形状并不规则,大小也不均一,这与大多数药物单体喷雾干燥结果一致^[33-34]。本实验通过药效实验表明, BH 粉雾剂与青霉素药效作用相当,对于治疗金黄色葡萄球菌肺炎药效作用显著。所以,今后将会进一步深入研究,通过增加适当的辅料或其他方法改善剂型, BH 吸入制剂可能成为药效显著优于青霉素的有效制剂。

参考文献

- [1] Muller-Redetzky H, Lienau J, Suttorp N, et al. Therapeutic strategies in pneumonia: Going beyond antibiotics [J]. *Eur Respir Rev*, 2015, 24(137): 516-524.
- [2] Li M, Zhang T, Zhu L, et al. Liposomal andrographolide dry powder inhalers for treatment of bacterial pneumonia via anti-inflammatory pathway [J]. *Int J Pharm*, 2017, 528(1/2): 163-171.
- [3] Loebinger M R, Wilson R. Bacterial pneumonia [J]. *Medicine*, 2008, 36(6): 285-290.
- [4] 魏思敏,唐志书,李慧敏,等. 山茱萸水提液银纳米颗粒的制备及其抑菌活性的研究 [J]. *中草药*, 2019, 50(1): 52-58.
- [5] 沈央,方晓玲. 三七总皂苷脂质体的药剂学性质及大鼠肺部给药药动学研究 [J]. *中草药*, 2004, 35(7): 30-34.
- [6] 姚艳胜,季鹏,刘畅,等. 柚皮素固体脂质纳米粒冻干粉制备及其大鼠肺部给药药动学研究 [J]. *中草药*, 2016, 47(4): 591-598.
- [7] 李纳,汤丹丹,王丽雯,等. 喷雾干燥法制备姜黄素磷脂复合物壳聚糖微球干粉吸入剂及其表征 [J]. *中草药*, 2014, 45(17): 2475-2481.
- [8] Kumar A, Ekavali, Chopra K, et al. Current knowledge and pharmacological profile of berberine: An update [J]. *Eur J Pharmacol*, 2015, 761: 288-297.
- [9] Da S A, de Andrade N J, Da S C, et al. Berberine antifungal activity in fluconazole-resistant pathogenic yeasts: Action mechanism evaluated by flow cytometry and biofilm growth inhibition in *Candida* spp. [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2016, 60(6): 3551-3557.
- [10] Li P, Liao S T, Wang J S, et al. Pharmacokinetic and NMR metabolomics approach to evaluate therapeutic effect of berberine and *Coptidis Rhizoma* for sepsis [J]. *Chin Herb Med*, 2019, 11(1): 28-38.
- [11] 刘彦辰. 盐酸小檗碱的抑菌抗炎作用机理研究 [D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2017.
- [12] 车美垚. 盐酸小檗碱抑制金黄色葡萄球菌 α -溶血素及其

- 诱导的氧化损伤 [D]. 长春: 吉林大学, 2018.
- [13] Xiao C W, Liu Y, Wei Q, *et al.* Inhibitory effects of berberine hydrochloride on trichophyton mentagrophytes and the underlying mechanisms [J]. *Molecules*, 2019, doi: 10.3390/molecules24040742.
- [14] Chen L, Bu Q, Xu H, *et al.* The effect of berberine hydrochloride on *Enterococcus faecalis* biofilm formation and dispersion *in vitro* [J]. *Microbiol Res*, 2016, 186/187: 44-51.
- [15] Wang X, Feng S, Ding N, *et al.* Anti-inflammatory effects of berberine hydrochloride in an LPS-induced murine model of mastitis [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2018, 2018: 5164314.
- [16] 惠 毅, 闫曙光, 李京涛, 等. 小檗碱与 6-姜烯酚配伍对溃疡性结肠炎小鼠结肠上皮细胞 Notch 信号通路的影响 [J]. *中草药*, 2019, 50(13): 3147-3154.
- [17] 郭江红, 任 刚, 蒋建东. 小檗碱通过改善代谢水平抗肝细胞癌的研究进展 [J]. *现代药物与临床*, 2018, 33(3): 703-708.
- [18] Wang X, Wang Q, Liu Z, *et al.* Preparation, pharmacokinetics and tumour-suppressive activity of berberine liposomes [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2017, 69(6): 625-632.
- [19] Li J, Liu F, Jiang S, *et al.* Berberine hydrochloride inhibits cell proliferation and promotes apoptosis of non-small cell lung cancer via the suppression of the MMP2 and Bcl-2/Bax signaling pathways [J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(5): 7409-7414.
- [20] Cui H X, Hu Y N, Li J W, *et al.* Preparation and evaluation of antidiabetic agents of berberine organic acid salts for enhancing the bioavailability [J]. *Molecules*, 2018, doi: 10.3390/molecules24010103.
- [21] 蔡 悦, 袁 捷, 刘晓龙, 等. 小檗碱对神经元保护作用机制的研究进展 [J]. *现代药物与临床*, 2018, 33(8): 2154-2158.
- [22] 刘 昊, 周志斌. 小檗碱调脂的研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2019, 42(8): 1676-1679.
- [23] Liu C S, Zheng Y R, Zhang Y F, *et al.* Research progress on berberine with a special focus on its oral bioavailability [J]. *Fitoterapia*, 2016, 109: 274-282.
- [24] Singh A, van Den Mooter G. Spray drying formulation of amorphous solid dispersions [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2016, 100: 27-50.
- [25] Mezhericher M, Levy A, Borde I. Heat and mass transfer of single droplet/wet particle drying [J]. *Chem Eng Sci*, 2008, 63(1): 12-23.
- [26] Su W, Wei T, Lu M, *et al.* Treatment of metastatic lung cancer via inhalation administration of curcumin composite particles based on mesoporous silica [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2019, 134: 246-255.
- [27] Shibue Y, Kimura S, Kajiwara C, *et al.* Role of interleukin-17 in a murine community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pneumonia model [J]. *Microb Infect*, 2019, 21(1): 33-39.
- [28] Deng J, Xiao J, Lv L, *et al.* Immunosuppressive therapy alleviates murine cytomegalovirus recurrence by reducing TNF-alpha post cell transplantation with lethal GVHD [J]. *Antiviral Res*, 2016, 133: 130-139.
- [29] Oakley D E. Spray dryer modeling in theory and practice [J]. *Dry Technol*, 2004, 22(6): 1371-1402.
- [30] Galli C. Experimental determination of the diffusion boundary layer width of micron and submicron particles [J]. *Int J Pharm*, 2006, 313(1/2): 114-122.
- [31] Zeng Q, Xie L, Zhang J, *et al.* Improving relative bioavailability of oral imidazolidinedione by reducing particle size using homogenization and ultra-sonication [J]. *Military Med*, 2019, 184(Suppl 1): 106-113.
- [32] Arora S, Haghi M, Young P M, *et al.* Highly respirable dry powder inhalable formulation of voriconazole with enhanced pulmonary bioavailability [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2016, 13(2): 183-193.
- [33] 施 敏. 喷雾干燥法制备 P (MMA-BA)、PLA/EC 中空微球及其性能研究 [D]. 长沙: 湖南大学, 2012.
- [34] 蒋艳荣, 张振海, 陈小云, 等. 硬脂酸改性纳米 CaCO_3 对当归喷雾干燥粉体的影响研究 [J]. *中草药*, 2013, 44(9): 1122-1127.