

单因素实验更加科学、完善和简便,为以后的分子鉴定工作的标准化、高重复性奠定了基础。本方法在其它 PCR 类体系的设计优化上有一定的指导作用和示范意义。

参考文献:

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 (28卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1980: 177.
- [2] 黎裕, 贾继增, 王天宇. 分子标记的种类及其发展 [J]. 生物技术通报, 1999, 4: 19.
- [3] 干滢, 曾凡亚, 赵云, 等. 油菜单株总 DNA 的快速制备 [J]. 四川大学学报 (自然科学版), 1999, 36(5): 936.
- [4] 谢运海, 夏德安, 姜静, 等. 利用正交设计优化水曲柳 ISSR-PCR

反应体系 [J]. 分子植物育种, 2005, 3(3): 445.

- [5] Bautista R, Crespi R, Francisco MC, et al. Identification of olive-tree cultivars with SCAR markers [J]. Euphytica 2002, 129: 33.
- [6] Jia H, Wang P, Jin DM, et al. The application of RAPD markers in diversity detection and variety identification of Porphyrin [J]. ACTA Bot Sin 2000, 42: 403.
- [7] Marinello L, Sommella MG, Sorrentino A et al. Identification of Prunus americana cultivars by RAPD and SCAR markers [J]. Biotechnol Lett 2002, 24: 749.
- [8] Nybm H and Barish IV. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants [J]. Perspect Plant Ecol Evol Syst 2000, 3: 93.

海藻酸钠-淀粉复合微球的制备及用于盐酸小檗碱的控制释放研究

江宇良, 刘庆林

(厦门大学化学化工学院, 福建 厦门 361005)

摘要:目的 应用天然药用高分子材料海藻酸钠和淀粉制备复合微球并研究其对盐酸小檗碱的控制释放性能。方法 采用改进的乳化凝胶法制备复合微球,用光学显微镜观察了微球的形态,共聚焦激光扫描显微镜观察了药物的分布情况,紫外分光光度计测定了药物包封率,并测定了药物在不同介质中的释放。结果 微球形态圆整,分散性好,包封率可达到 80% 以上,对盐酸小檗碱具有一定的缓控释效果。结论 以海藻酸钠和淀粉为原料制备了性能良好的复合微球。

关键词: 海藻酸钠; 淀粉; 微球; 盐酸小檗碱

中图分类号: R283 文献标识码: A 文章编号: 1008-0805(2010)01-0025-02

Preparation of Alginate-starch Blend Microspheres for Controlled Release of Berberine Hydrochloride

JIANG Yu-liang LIU Qing-lin

(The College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract Objective To prepare blend microspheres natural polymers alginate and starch and to study their controlled release performance on berberine hydrochloride. **Methods** A modified emulsification/gelation method was applied to prepare blend microspheres. Shape of those microspheres was observed with optical microscope. Drug distribution inside the microspheres was observed with CLSM. Encapsulation efficiency was determined by UV-spectrophotometer. Drug release performance in two medium was also tested. **Results** Microspheres appeared to be spherical and well dispersed in water. Encapsulation efficiency was higher than 80%. Microspheres was found to have a certain effect on the controlled release of berberine hydrochloride. **Conclusion** - Blend microspheres with good performance were prepared with alginate and starch.

Key words Alginate; Starch; Microsphere; Berberine hydrochloride

盐酸小檗碱 (berberine hydrochloride) 又称盐酸黄连素, 是一种异喹啉生物碱, 其药理作用十分广泛, 如抗菌、抗癌、抗炎、降血糖浓度、降胆固醇、舒张血管^[1] 等。海藻酸钠和淀粉都属于天然高分子材料, 和人体相容性好, 并具有来源广泛、价格便宜的优势。海藻酸钠可以被多价阳离子 (如 Ca^{2+}) 交联形成“蛋格”结构^[2] 而瞬时凝胶化, 反应条件温和, 因而作为原料常被用来制备载药微球。复合微球通常被认为比单种材料制备的微球更具优势^[3], 由于淀粉和海藻酸钠结构类似, 相容性好, 用它们作为材料来制备复合载药微球, 可以在保证对人体无毒害的条件下, 实

现药物缓控释, 减少服药次数, 降低药物的毒副作用, 提高药物的稳定性和生物利用度。

1 材料与仪器

1.1 材料 盐酸小檗碱 (98%) 购自西安飞达生物技术有限公司; 海藻酸钠为化学纯 (高粘度) 购自广东西陇化工厂; 可溶性淀粉 (分析纯) 购自国药化学试剂公司; 其余试剂均为分析纯。

1.2 仪器 94-2 恒温磁力搅拌器 (上海梅颖浦仪器仪表制造有限公司)。Tu-1900 型紫外分光光度计 (北京普析通用仪器有限公司)。CEM-300 荧光生物显微镜 (上海长方光学仪器厂)。MRC1024 型激光共聚焦显微镜 (英国 Bio-Rad 公司)。

2 方法与结果

2.1 海藻酸钠-淀粉复合微球的制备 采用改进的乳化凝胶法, 首先配置 1.5% 海藻酸钠 (W/V)、1.5% 淀粉 (W/V) 和 1% 盐酸小檗碱的 20 ml 混合水溶液, 然后加入 60 ml 液体石蜡作为油相, 2 ml 司盘-80 和吐温-80 (9:1 V/V) 作为乳化剂, 搅拌形成乳液 A。同样, 配置 6 ml 质量浓度为 8% 的 CaCl_2 溶液, 加入 20 ml 液

收稿日期: 2008-12-09 修订日期: 2009-06-01

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 50573063);

教育部新世纪优秀人才计划项目 (Na NCET-05-0566);

高等学校博士点专项基金 (No. 2005038401)

作者简介: 江宇良 (1985-), 男 (汉族), 江西樟树人, 现为厦门大学生物化工专业在读硕士研究生, 主要从事生物材料研究工作。

体石蜡和 0.5 ml 乳化剂后再加入 2 ml 乙醇搅拌均匀得到乳液 B。光学显微镜下观察均形成稳定乳液后将乳液 B 加入乳液 A 中进行交联反应。10 min 后停止反应，离心分离得到微球，依次用醋酸乙酯、无水乙醇、去离子水进行洗涤，室温放置干燥。不加入盐酸小檗碱而其他条件相同以制备空白微球。

2.2 标准曲线的测定

2.2.1 测定吸收波长的选取 分别精密配置 20 μg/ml 的盐酸小檗碱水溶液和 20 μg/ml 的空白微球溶液，用紫外分光光度计在波长为 200~700 nm 处进行扫描，得到吸收曲线（见图 1），盐酸小檗碱分别在波长为 227, 265 和 345 nm 处有 3 个大的吸收峰，空白微球在波长超过 330 nm 后基本无吸收，为避免空白微球对药物浓度测定的影响，选取 345 nm 作为测定吸收波长。

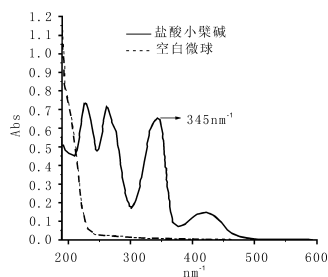


图 1 空白微球和盐酸小檗碱的紫外光谱扫描

2.2.2 标准曲线的绘制 精密称取 5 mg 盐酸小檗碱溶于去离子水中并定容于 100 ml 容量瓶中。分别取 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 和 8.0 ml 置于 10 ml 容量瓶中，用去离子水稀释至刻度，在 345 nm 波长处测定盐酸小檗碱的吸光度，绘制吸光度对浓度 (μg · ml⁻¹) 的标准曲线，并求得回归方程为: $Y = 0.06565X - 0.02254$, $r = 0.9998$ 表明盐酸小檗碱在 10~40 μg · ml⁻¹ 的浓度范围内线性关系良好。

2.3 微球包封率的测定和计算 取载药微球 5 mg 用 1% (W/V) EDTA 溶液定容于 100 ml 容量瓶中。置于恒温振荡器中，在 (37 ± 0.5) °C 下以 150 r/min 的转速振荡 30 min 后用移液管取 5 ml 上述溶液，在 345 nm 处采用紫外分光光度计测定吸光度，根据标准曲线得到浓度，计算药物含量，通过下式计算出包封率为 82.1%。

$$\text{包封率}(\%) = \frac{\text{包裹于微球中的盐酸小檗碱含量}}{\text{总药量}} \times 100\%$$

2.4 微球在不同介质中的药物释放曲线 分别含有 500 ml pH 7.4 磷酸盐缓冲液 (0.01 mol · l⁻¹) 和 500 ml pH 1.2 盐酸溶液的两个 600 ml 烧杯置于恒温水浴振荡器中，在 (37 ± 0.5) °C 以 100 r/min 的转速振荡。依次加入 20 mg 载药微球并记录时间，在设定的间隔时间点用移液管取出 5 ml 介质并随即加入等量的同种介质，用紫外分光光度计测定浓度，浓度换算成药物含量并对时间做曲线。见图 2。

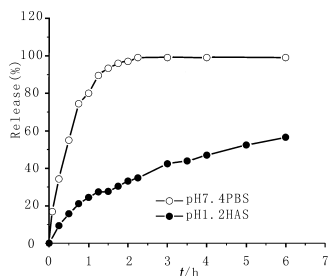


图 2 载药微球在不同介质中的释放曲线

2.5 微球形态及药物分布

2.5.1 光学显微镜观察微球形态 制备好的微球分散于去离子

水中，超声处理 2 min 后，取 1 滴至载玻片上，盖上盖玻片，用荧光生物显微镜观察并拍照（见图 3）。微球形态圆整，分散性好。

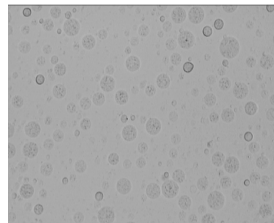


图 3 载药复合微球的光学显微照片 (100×)

2.5.2 激光共聚焦显微镜观察药物分布 由于盐酸小檗碱有荧光性，而海藻酸钠和淀粉都没有荧光性，因而可以在激光共聚焦显微镜下观察盐酸小檗碱在复合微球内的分布状况，制备好的微球分散于去离子水中，超声 1 min 后取一滴置于盖玻片上，采用激发波长为 488 nm 的氩激光器，于激光共聚焦显微镜下观察，并拍照（见图 4），药物被很好地包裹在复合微球内，且分布均匀。

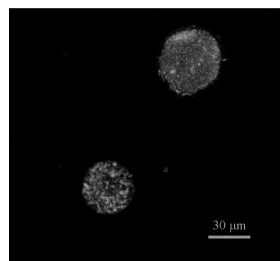


图 4 载药复合微球的激光共聚焦显微镜照片

3 讨论

由于海藻酸钠和钙离子的交联反应迅速剧烈，制备过程中如果直接向乳液 A 中滴加 CaCl₂ 溶液容易造成微球相互聚集^[4]，双乳液可以有效地避免这一状况。

由于盐酸小檗碱水溶性差，因此释放介质的量大，可以增加药物释放量。

药物在 pH 7.4 磷酸盐缓冲液和 pH 1.2 盐酸溶液中释放速率差异大，这是由于一方面海藻酸钠在 pH > 3 时带负电荷，同种电荷的相互排斥作用使得海藻酸钠呈舒展态，微球的溶胀度较大，而当 pH < 3 时海藻酸钠质子化而呈收缩态，微球溶胀度较小；另一方面磷酸盐缓冲液中的 Na⁺ 和微球内的 Ca²⁺ 发生离子交换反应，而导致微球部分分解，从而加快药物的释放^[5]。

盐酸小檗碱在复合微球内的包封率可达到 80% 以上，且分布均匀，微球对药物具有缓控释功能。

参考文献:

[1] Ko WH, Yao XQ, Lau CW, et al. Vasorelaxant and antiproliferative effects of berberine [J]. Eur J Pharmacol. 2000, 399 (2-3): 187.
 [2] Skonski P, Mo F, Skjak-Brak G, et al. Evidence for Egg-Box-Compatible Interactions in Calcium? Alginate Gels from Fiber X-ray Diffraction [J]. Biomaecromolecules. 2007, 8 (7): 2098.
 [3] Babu VR, Sairam M, Hosan K M, et al. Preparation of sodium alginate-methylcellulose blend microspheres for controlled release of nifedipine [J]. Carbohydr Polym. 2007, 69(2): 241.
 [4] Chan LW, Lee Heng PWS. Production of alginate microspheres by internal gelation using an emulsification method [J]. Int J Pharm. 2002, 242 (1-2): 259.
 [5] Lemoine D, Wauters F, Bouchendhomme S, et al. Preparation and characterization of alginate microspheres containing a model antigen [J]. Int J Pharm. 1998, 176(1): 9.