

# 小檗碱壳聚糖微球制备及其抗真菌活性测定

侯东耀<sup>1</sup>, 葛喜珍<sup>2</sup>, 刘军锋<sup>1</sup>, 田平芳<sup>1</sup>, 谭天伟<sup>1</sup>

(1. 北京化工大学生命科学与技术学院, 北京 100029; 2. 北京联合大学生物化学工程学院, 北京 100023)

**摘要:** 采用乳化-化学交联法制备了负载小檗碱的壳聚糖微球. 以正交实验对微球形态、粒径、药物包封率和载药率等指标进行了制备工艺条件优化. 显微镜和电镜观察显示微球球形良好, 表面光滑, 平均粒径约 15  $\mu\text{m}$ , 包封率为 78.98%, 载药率为 4.78%. 持续 30 d 的药物释放实验表明, 小檗碱可从微球中缓慢释放. 利用生长速率法测定了微球对 3 种重要植物病原真菌的抑制作用, 5  $\mu\text{g/mL}$  微球对番茄早疫病菌(*Alternaria solani*)的抑菌率达 65%.

**关键词:** 小檗碱; 壳聚糖; 微球; 抗真菌活性

**中图分类号:** R944.9; S482.2

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1009-606X(2008)05-0962-05

## 1 前言

传统化学农药制剂主要为乳油, 因含有大量苯类有机溶剂而污染环境, 并且在施用造成大量流失和分解, 对生态环境和人类健康构成严重威胁. 微胶囊剂能控制药物释放速度, 提高农药利用率, 减少环境污染并降低对人体的危害, 成为农药新剂型研发的热点<sup>[1]</sup>. 微球(Microsphere)是以高分子材料作为囊壁或囊膜, 通过化学、物理或物理化学的方法, 将作为囊心的农药活性物质包裹起来, 形成具有半渗透性囊膜的微型胶囊, 并使其以适当浓度稳定地分散、悬浮在作为连续相的水中. 其优势在于囊心因被包覆而与外环境隔离, 从而免受外界因素的影响, 在适当条件下可以被缓慢释放出来<sup>[2,3]</sup>. 虽然微胶囊技术在生物农药中的应用报道较少, 但因其诸多优点成为新剂型研发的重要方向.

壳聚糖(Chitosan)又叫 $\beta$ -1,4-聚-葡萄糖胺, 具有优良的生物降解性和生物亲和性, 毒性低, 是迄今发现的唯一天然碱性多糖. 其分子链上丰富的氨基使其易与聚阴离子化合物发生静电吸引. 在药物制剂方面, 尤其应用于缓释和控释制剂, 已有广泛研究基础<sup>[2-4]</sup>. 壳聚糖具有广谱抗菌性, 可诱导植物产生抗病性, 已广泛应用于农业领域<sup>[5-8]</sup>.

本工作以壳聚糖为囊壁材料, 以小檗碱作为控释对象, 研究制备微球最佳工艺并测定了微球对植物病原真菌的抑制活性.

## 2 实验

### 2.1 材料和仪器

壳聚糖(脱乙酰度 87%, 美国 Sigma Aldrich 公司)、

小檗碱(中国药品生物制品检定所)、Span-80 和 50%戊二醛溶液及其他试剂(北京化工厂)均为分析纯. JY92-II 型超声波细胞破碎仪(宁波新芝科器研究所), 恒温式振荡器, Olympus 光学显微镜. Hitachi S-4700 型场发射低真空扫描电镜(日本日立公司), 紫外-可见分光光度计(美国 Varian 公司).

### 2.2 样品制备

#### 2.2.1 乳化-化学交联法制备小檗碱壳聚糖微球

称取一定量壳聚糖和小檗碱加入 2% 的醋酸溶液中, 充分溶胀后搅拌使之溶解, 静置, 去气泡. 将溶液用针管逐滴加入含 2% Span-80 的油相中, 搅拌, 乳化 30 min 后形成水/油体系. 逐滴加入 50%戊二醛溶液 1 mL, 搅拌数小时, 离心, 使微球完全沉降, 弃上清, 所得微球用石油醚洗涤 3 次, 真空干燥 24 h, 用电子分析天平精密称重<sup>[2,9]</sup>.

#### 2.2.2 正交实验设计法优化制备工艺

为优化制备工艺, 根据预实验结果及相关文献, 在单因素实验基础上选定壳聚糖质量、投药比、交联剂用量和水/油相比(W/O)四因素, 各 3 个水平, 按  $L_9(3^4)$  正交设计要求, 对不同因素和水平列出 9 种组合进行分析<sup>[10]</sup>.

### 2.3 分析

#### 2.3.1 正交实验设计数据的评价

以微球平均粒径、载药量及包封率作为优化指标, 筛选小檗碱壳聚糖微球的最佳制备工艺<sup>[10]</sup>. 用光学显微镜观察, 测微尺测定微球粒径, 计数 500 个以上, 以平均值作为评价指标. 将小檗碱壳聚糖微球置入 2% 乙酸中, 超声破碎, 测定小檗碱的含量, 以此推算微球的含药量, 并计算微球的载药量及包封率, 最后优选出最佳工艺条件.

### 2.3.2 小檗碱壳聚糖微球的表征

光镜观察:将干燥微球均匀洒在载玻片上,在生物显微镜 400 倍下观测制片,计数 500 个微球求取平均直径.电镜观察:将干燥微球均匀洒在样品台上,用导电胶固定后真空溅金,用场发射低真空扫描电镜观察微球形貌.

### 2.3.3 小檗碱壳聚糖微球的载药率及包封率

用 2% 的醋酸分别配制不同浓度(C)小檗碱溶液,以 2% 醋酸为空白,用紫外分光光度计测定 345 nm 下的吸光度 A,得标准曲线:  $A=0.0511C+0.0227$ ,  $R^2=0.9997$ .

取一定量载有小檗碱的壳聚糖微球,在研钵中磨碎后用定量的 2% 乙酸溶解,并充分超声破碎,用紫外分光光度计测定小檗碱的浓度,根据下式计算壳聚糖微球的包封率  $S_1$  及载药率  $S_2$ :

微球包封率  $S_1=(\text{微球内药量}/\text{制备中加入的总药量})\times 100\%$ ,

微球载药率  $S_2=(\text{微球内药量}/\text{微球总质量})\times 100\%$ .

### 2.3.4 微球体外释放度的测定

准确称取定量小檗碱壳聚糖微球密封于透析袋内,置于 pH 6.8 的磷酸盐缓冲液中,在恒温式振荡器中调节转速 100 r/min,模拟菌生长环境温度  $[(30\pm 0.1)^\circ\text{C}]$ ,于设定时间取样,同时补加同量新鲜稀释液.用紫外分光光度计测定 345 nm 下释放液中的小檗碱吸光度,换算成浓度,计算小檗碱的累计释放率(Release rate, RA):

$$RA(\%)=CV/(mS_2)\times 100\%$$

式中, C 为溶液中小檗碱浓度( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), V 为释放介质体积(mL), m 为载药干球质量(mg),  $S_2$  为载药率(%). 制作释放率-时间曲线,考察微球释药性能.

### 2.3.5 微球对 3 种植物病原菌抑菌作用的测定

取制备的微球 1.5 g 与 300 mL 灭菌溶化的 PDA 培养基混匀,倒皿(9 cm),冷却成平板.无菌条件下,用孔径 0.6 cm 的打孔器取菌落边缘生长旺盛的菌饼移入 PDA 平板,每个处理重复 5 次,以无药培养基所制的平板作为空白对照.27 $^\circ\text{C}$  恒温培养,每隔 24 h 测定 1 次菌落直径,直至对照平板的菌落长至培养皿边缘,计算抑制率.

菌落直径(cm)=测量菌落的直径平均值-0.6(菌饼直径),

菌丝生长抑制率= $\frac{\text{对照组纯生长量}-\text{处理组纯生长量}}{\text{对照组菌落直径}}\times 100\%$ .

对照组菌落直径

## 3 结果与讨论

### 3.1 预实验

研究了不同条件对微球成形、粒径及分布的影响,为制备优良微胶囊探索最佳反应条件.

### 3.1.1 小檗碱壳聚糖微球油相的选择

取大豆油、液体石蜡、色拉油和花生油 4 种碳链长度不同的油相各 50 mL,其他制备条件与 2.2.1 节一致,制备微球,微球成囊结果见表 1.实验表明,由于不同油相的粘度不同,故成囊性有差异,大豆油作为油相的成囊性最佳,故选定大豆油为油相.

表1 油相对微球形貌的影响

Oil	Phenomenon and result
Soya oil	A lot of orbicular spheres
Paraffine	No product
Salad oil	Almost no product
Peanut oil	A little spheres

### 3.1.2 溶液 pH 对小檗碱壳聚糖微球的影响

从表 2 可见,溶液 pH 对微球成囊有很大影响. pH 不仅影响壳聚糖所带电荷的空间构象,而且影响所包埋物质的空间构象和所带电荷.壳聚糖是弱聚碱,其解离常数  $\text{Pka}=6.3$ ,当  $\text{pH}<\text{Pka}$  时,壳聚糖分子链上的氨基主要以  $-\text{NH}_3^+$  形式存在,随着 pH 的升高,  $-\text{NH}_3^+$  减少.当溶液 pH 接近 Pka 时,壳聚糖分子的电荷密度显著降低,导致其分子结构疏松,可以更有效地包含小檗碱,通过静电作用形成致密的微球.制备微球的理想 pH 为 4.5.

表2 反应液 pH 对微球形貌的影响

pH	Phenomenon and result
3.5	A little small spheres, inhomogenous particle size distribution
4.5	More small spheres, narrow particle size distribution
5.5	Narrow particle size distribution
6.5	No product

### 3.1.3 温度对小檗碱壳聚糖微球的影响

实验表明,交联温度过低不利于微胶囊的成形和有机溶剂的交联,随着温度升高微球直径越来越小,粒径分布变宽,加热温度过高,壳聚糖变性和芯材的快速析出使微胶囊形态恶化.表 3 为不同温度对微胶囊成球的影响,制备微球的理想温度为 45 $^\circ\text{C}$ .

表3 交联温度对微球形貌的影响

Temp. ( $^\circ\text{C}$ )	Phenomenon and result
25	A little small spheres, inhomogenous particle size distribution
35	More small spheres, narrow particle size distribution
45	More small spheres, narrow particle size distribution
55	No product

### 3.1.4 交联时间对小檗碱壳聚糖微球的影响

由表 4 可知,随着交联时间的延长,微球逐渐变得光滑圆整.原因可能是当交联时间较短时,交联度较低,微球表面结构比较疏松,体系平衡遭到破坏后,微球又

重新分解,在后续的离心洗涤和干燥过程中微球容易变形.而时间较长时微球结构紧密,制成成品后仍然圆整

表4 交联时间对微球形貌的影响

Time (h)	Phenomenon	Embedding (% , $\omega$ )	Drug loading (% , $\omega$ )
1	Inhomogenous particle size distribution	45.2	1.78
2	Inhomogenous particle size distribution	43.1	1.93
3	Narrow particle size distribution	61.2	2.75
4	Narrow particle size distribution	54.1	2.89

光滑,而且载药率也增大.综合考虑交联时间3h为佳.

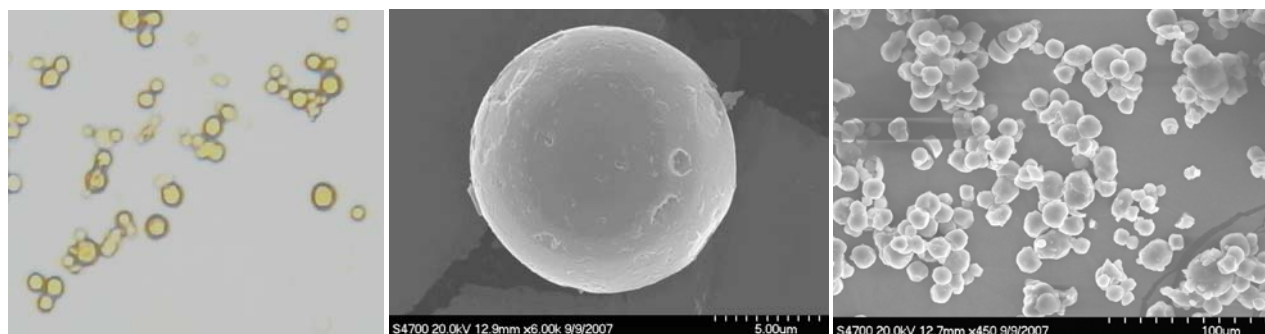
### 3.2 正交实验结果

由表5的极差分析结果可知,各因素对所制微球综合指标影响次序为壳聚糖质量(A)>投药比(Chitosan/berberine, B)>交联剂用量(D)>水/大豆油比(C).制备微球的最佳条件为  $A_2B_2C_2D_2$ . 该优化条件下的实验结果(3次平行实验)为包封率78.98%,载药率4.78%,表明优化条件是可行的.

表5 正交实验方案及结果

No	Mass of chitosan, A (g)	Chitosan/berberine, B (g/g)	W/O, C (mL/mL)	Cross-linking reagent, D (mL)	$S_1^{(1)}$ (%)	$S_2^{(2)}$ (%)	$S_1+S_2$ (%)
1	0.25	5	30	1	43.52	3.78	47.30
2	0.25	10	70	1.2	62.91	2.88	65.79
3	0.25	15	50	0.8	49.09	1.93	51.02
4	0.2	5	70	0.8	68.91	5.75	74.66
5	0.2	10	50	1	75.37	3.47	78.84
6	0.2	15	30	1.2	73.59	1.94	75.53
7	0.3	5	50	1.2	54.42	4.16	58.58
8	0.3	10	30	0.8	66.71	3.15	69.86
9	0.3	15	70	1	59.09	1.94	61.03
$K_1$	164.11	180.54	192.69	187.17			
$K_2$	229.03	214.49	201.48	199.90			
$K_3$	189.47	187.58	188.44	195.54			
$K_{max}-K_{min}$	64.92	33.95	13.04	12.73			

Note : 1) Embedding rate; 2) Drug loading rate.



(a) Microspheres under optic microscope (400 $\times$ ) (b) Single microsphere under electron microscope (c) Microspheres under electron microscope

图1 小檗碱壳聚糖微球形态图片

Fig.1 Appearance of berberine-loaded chitosan microspheres

### 3.3 微球表面形态观察及粒径分析

按优化条件制备的干态微球用光学显微镜和扫描电镜拍照(图1),可见微球圆整,表面光滑,结构较致密,球体内部为黄色,外壳为黑色,故推测囊心为小檗碱,囊壁为壳聚糖,在水溶液中分散性良好.根据统计粒径数据作粒径分布图(图2),平均直径约15 $\mu$ m左右.

### 3.4 微球体外释放曲线

小檗碱壳聚糖微球在模拟外部环境(pH 6.8的磷酸缓冲液)中的释药情况如图3所示.释药规律符合Higuchi方程:  $Q=0.1413t^{1/2}+0.0699$ ,  $R^2=0.9846$ . 药物释放初期速度较快,在1d内即达20%;随着时间的推移,释放速度明显变缓,30d后释放达到80%,可见小檗

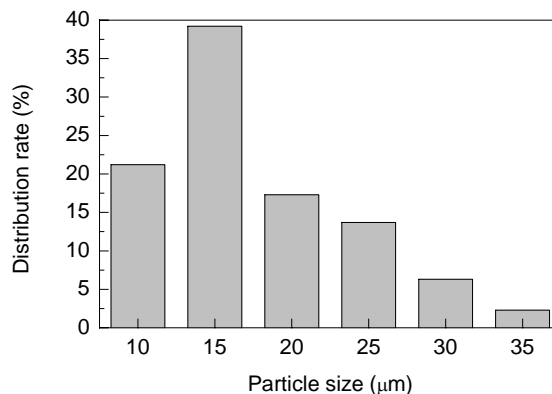


图2 小檗碱壳聚糖微球的粒径分布

Fig.2 Particle size distribution of berberine-loaded chitosan microspheres

碱壳聚糖微球具有明显的缓释效果。

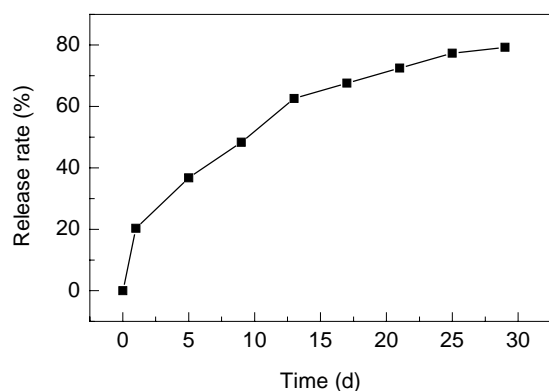


图 3 小檗碱壳聚糖微胶囊的体外释放曲线  
Fig.3 *In vitro* release curve of berberine-loaded chitosan

### 3.5 微球的抑菌作用

5  $\mu\text{g/mL}$  小檗碱壳聚糖微球在不同时间内对 3 种病原真菌生长的平均抑制率结果见图 4, 对 3 种病原真菌均表现出不同程度的抑制作用, 虽然不同时间内的抑菌率差别很大, 但都保持着长久的抑菌作用. 7 d 时未加药

与加药的番茄早疫菌落(*Alternaria solani*)的平板实验结果如图 5(a), 未加药与加药的番茄灰霉菌菌落(*Botrytis cinerea*)的平板实验结果如图 5(b). 其中对番茄早疫病菌抑制率高达 65% [图 4, 5(a)], 对较顽固的番茄灰霉抑制率也将近 60% [图 4, 5(b)]. 可见小檗碱对番茄早疫病菌有强烈的抑制作用。

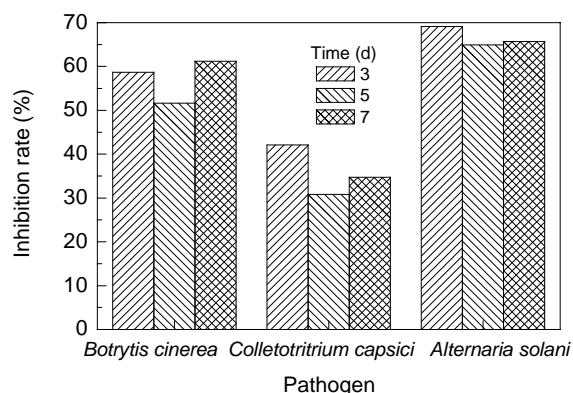


图 4 小檗碱壳聚糖微球对 3 种植物病原菌的抑制率  
Fig.4 Inhibiting effect of berberine-loaded chitosan microspheres on mycelium growth of plant pathogens



Control, without berberine PDA plate containing berberine  
(a) *Alternaria solani*



Control, without berberine PDA plate containing berberine  
(b) *Botrytis cinerea*

图 5 7 d 时间内小檗碱壳聚糖微球对番茄早疫菌和番茄灰霉的抑制效果

Fig.5 Inhibiting effect of berberine-loaded chitosan microsphere against *Alternaria solani* and *Botrytis cinerea* in 7 d

以壳聚糖为载体、戊二醛为交联剂, 选择适当乳化体系制备小檗碱壳聚糖微球是基于如下考虑: (1) 小檗碱是廉价易得的天然产物, 除广谱抗细菌外, 还对许多真菌具有抑制作用<sup>[11-13]</sup>, 以其为控释对象, 可同时抑制许多细菌及某些真菌; (2) 壳聚糖可诱导植物产生抗病性(Induced resistance)<sup>[5-8]</sup>, 而诱导抗性类似动物免疫反应, 是现代农药研发的新思路; (3) 由于传统化学农药的非天然性, 不仅污染环境, 而且危害人体健康, 因此纯天然生物农药是当今农药研发的方向. 小檗碱和壳聚糖均为天然产物, 且价廉易得, 将二者制备成缓释剂型, 不仅对环境友好, 而且因其缓释特点而损耗较少, 从而降低了成本。

## 4 结论

(1) 采用乳化-化学交联法, 经过预实验和 4 因素 3

水平正交实验, 对温度、油相、pH、交联时间、投药比、药物用量、W/O 相比等多项指标进行了优化, 制备了粒径较小的小檗碱壳聚糖缓释微球, 发现微球球形良好, 表面光滑, 平均粒径约 15  $\mu\text{m}$ , 包封率为 78.98%, 载药率为 4.78%。

(2) 持续 30 d 缓释实验表明, 小檗碱壳聚糖微球具有很好的缓释效果。

(3) 虽然微球中的小檗碱含量较少, 但对多种植物病原真菌具有明显的抑制效果, 对番茄早疫菌和番茄灰霉菌表现出大于 60% 的抑制率, 提示该微球在防治番茄病变上具有应用价值。

### 参考文献:

- [1] Quaglia F, Barbato F, DeRosa G, et al. Reduction of the Environmental Impact of Pesticides: Waxy Microspheres Encapsulating the Insecticide Earbaryl [J]. J. Agric. Food Chem.,

- 2001, 49(10): 4808–4812.
- [2] Thanoo B C, Sunny M C, Jayakrishnan A. Cross-linked Chitosan Microsphere: Preparation and Evaluation as a Matrix for the Controlled Release of Pharmaceuticals [J]. *J. Pharm. Pharmacol.*, 1992, 44(4): 283–286.
- [3] Agnihotri S A, Mallikarjuna N N, Aminabhavi T M. Recent Advances on Chitosan-based Micro- and Nanoparticles in Drug Delivery [J]. *J. Controlled Release*, 2004, 100(1): 5–28.
- [4] Mi F L, Shyu S S, Chen C T, et al. Porous Chitosan Microspheres for Controlling the Antigen Release of Newcastle Disease Vaccine: Preparation of Antigen-adsorbed Microsphere and *in vitro* Release [J]. *Biomaterials*, 1999, 20(17): 1603–1612.
- [5] Doares S H, Syrovets T, Weiler E W, et al. Oligogalacturonides and Chitosan Activated Plant Defensive Genes through the Octadecanoid Pathway [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, 92: 4095–4098.
- [6] Vasiukova N I, Chalenko G I, Gerasimova N G, et al. Derivatives of Chitin and Chitosan as Elicitors of Potato Resistance to Late Blight [J]. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.*, 2000, 36(4): 433–438.
- [7] Benhamou N. Enhanced Resistance of Tomato Plants to *Fusarium Oxysporum f. sp. radicis-lycopersici* upon Treatment with Chitosan: Cytochemical Aspects of Induced Resistance [J]. *Hort Science*, 1994, 29: 230–340.
- [8] Reddy M V B, Arul J, Angers P, et al. Chitosan Treatment of Wheat Seeds Induces Resistance to *Fusarium graminearum* and Improves Seed Quality [J]. *J. Agric. Food Chem.*, 1999, 47(3): 1208–1216.
- [9] 宋薇, 马光辉, 苏志国. 复乳法制备大孔聚合物微球[J]. *过程工程学报*, 2007, 7(5): 1029–1034.
- [10] Pavanetto F, Perugini P, Conti B, et al. Evaluation of Process Parameters Involved in Chitosan Microsphere Preparation by the O/W/O Multiple Emulsion Method [J]. *J. Microencapsulation*, 1996, 13(6): 679–688.
- [11] Basha S A, Mishra R K, Jha R N, et al. Effect of Berberine and (+/-)-Bicuculline Isolated from *Corydalis chaerophylla* on Spore Germination of Some Fungi [J]. *Folia Microbiol. (Praha)*, 2002, 47(2): 161–165.
- [12] Cernakova M, Kostalova D. Antimicrobial Activity of Berberine a Constituent of *Mahonia aquifolium* [J]. *Folia Microbiol. (Praha)*, 2002, 47(4): 375–378.
- [13] Singh B, Srivastava J S, Khosa R L, et al. Individual and Combined Effects of Berberine and Santonin on Spore Germination of Some Fungi [J]. *Folia Microbiol. (Praha)*, 2001, 46(2): 137–142.

## Preparation of Berberine-loaded Chitosan Microspheres and Their Fungistasis

HOU Dong-yao<sup>1</sup>, GE Xi-zhen<sup>2</sup>, LIU Jun-feng<sup>1</sup>, TIAN Ping-fang<sup>1</sup>, TAN Tian-wei<sup>1</sup>

(1. College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China;

2. Bioengineering College of Beijing Union University, Beijing 100023, China)

**Abstract:** Berberine-loaded chitosan microspheres were prepared by emulsion–chemical crosslinking technique. The preparation conditions were optimized by orthogonal experimental design with respect to particle size distribution, embedding rate and drug loading. The prepared microspheres showed perfect spherical geometry, smooth surface and suitable size distribution while observed under optic and scanning electron microscopes. The average diameter of microspheres was 15  $\mu\text{m}$ , with drug loading of 4.78% and embedding rate of 78.98%. Subsequently, their drug release *in vitro* was tested in the phosphate buffered saline (pH 6.8) for 30 d, and the release curve demonstrated an appropriate speed. In addition, inhibitory rates of the microspheres against *Alternaria solani*, *Colletotrichum capsici* and *Botrytis cinerea* were determined using growth rate method at microsphere concentration of 5  $\mu\text{g/mL}$ . Exhilaratingly, the microspheres showed 65% inhibitory rate against *Alternaria solani*, one predominant pathogen causing post-harvest disease of tomato.

**Key words:** berberine; chitosan; microsphere; fungistasis