

α -倒捻子素/甘草酸纳米胶束的制备、表征及评价

郑慧敏¹, 王兰¹, 王艳^{1*}, 郭若曦², 武改红², 王军², 张蕾², 张秀君³, 李雪⁴

(1. 天津中医药大学中药制药工程学院, 现代中医药海河实验室, 天津 301617) (2. 天津尚美化妆品有限公司, 天津 300385) (3. 天津中医药研究院附属医院, 天津 300120) (4. 天津医科大学总医院, 天津 300052)

摘要: 制备 α -倒捻子素/甘草酸纳米胶束 (α -Mangostin/glycyrrhizic Acid Nanomicelles, α -MG/GA NMs), 以提高 α -倒捻子素 (α -Mangostin, α -MG) 的溶解度和抗氧化活性。以甘草酸 (Glycyrrhizic Acid, GA) 为载体制备 α -MG/GA NMs, 并进行工艺优化, 表征和体外释放度、体外抗氧化活性评价。结果表明, 在最佳工艺下制得的 α -MG/GA NMs 中 α -MG 溶解度为 232.65 μ g/mL, 比水中溶解度大了近 1163 倍; α -MG/GA NMs 粒径为 123.46 nm, PDI 为 0.24, Zeta 电位为 -20.94 mV; 透射电镜 (TEM) 和扫描电镜 (SEM) 显示其为类球形; 冻干后在光照、高温、高湿条件下稳定性良好; 傅里叶红外光谱 (FT-IR) 显示 α -MG 与 GA 可能发生氢键相互作用; 体外释放结果表明 α -MG/GA NMs 能促进 α -MG 释放, 具有缓释效果, 在 pH 值 7.4、5.0 的释放介质中 24 h 累积释放率分别为 47.03%、40.56%; 与游离 α -MG 相比, α -MG/GA NMs 的抗氧化活性更强, 且 GA 与 α -MG 具有协同抗氧化作用, 对 DPPH 自由基、ABTS⁺ 自由基清除作用的协同指数 (CI 值) 分别为 0.62、0.58。该研究制备的 α -MG/GA NMs 提高了 α -MG 的溶解度与抗氧化活性, 为 α -MG 在食品、药品、化妆品等领域的应用提供了理论基础。

关键词: α -倒捻子素; 甘草酸; 纳米胶束; 溶解度; 抗氧化

文章编号: 1673-9078(2024)08-61-69

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.8.1073

Preparation, Characterization and Performance Evaluation of α -Mangostin/Glycyrrhizic Acid Nanomicelles

ZHENG Huimin¹, WANG Lan¹, WANG Yan^{1*}, GUO Ruoxi², WU Gaihong², WANG Jun², ZHANG Lei², ZHANG Xiujun³, LI Xue⁴

(1. College of Pharmaceutical Engineering of Traditional Chinese Medicine, Haihe Laboratory of Modern Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China) (2. Tianjin Shangmei Cosmetics Co. Ltd., Tianjin 300385, China) (3. Tianjin Academy of Traditional Chinese Medicine Affiliated Hospital, Tianjin 300120, China) (4. Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China)

Abstract: α -Mangostin/glycyrrhizic acid nanomicelles (α -MG/GA NMs) were prepared to improve the solubility and antioxidant activity of α -mangostin (α -MG). Glycyrrhizic acid (GA) was used as the carrier to prepare α -MG/GA NMs, and single factor design and response surface methodology were adopted to optimize the preparation process. The characteristics,

引文格式:

郑慧敏, 王兰, 王艳, 等. α -倒捻子素/甘草酸纳米胶束的制备、表征及评价[J]. 现代食品科技, 2024, 40(8): 61-69.

ZHENG Huimin, WANG Lan, WANG Yan, et al. Preparation, characterization and performance evaluation of α -mangostin/glycyrrhizic acid nanomicelles [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(8): 61-69.

收稿日期: 2023-09-08

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (81602773)

作者简介: 郑慧敏 (1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药产品与开发, E-mail: hui980621@163.com

通讯作者: 王艳 (1977-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 中药产品与开发, E-mail: paozhijiaoxue@126.com

in vitro release, and *in vitro* antioxidant activity of α -MG/GA NMs were evaluated. The results show that the solubility of α -MG in α -MG/GA NMs prepared under the optimal conditions reached 232.65 $\mu\text{g/mL}$, which is nearly 1163 times higher than that in water. The particle size of α -MG/GA NMs was 123.46 nm, and their PDI and zeta potential were 0.24 and -20.94 mV, respectively. Transmission electron microscopy (TEM) and scanning electron microscopy (SEM) showed that the NMs are spherical. After freeze-drying, the α -MG/GA NMs prepared were stable under irradiation at high temperature and high humidity. Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) showed that hydrogen bonding interactions between α -MG and GA may take place. The *in vitro* release analysis demonstrated that α -MG/GA NMs can promote the release of α -MG and have a sustained release effect. The cumulative release rates of α -MG/GA NMs were 47.03% and 40.56% in release media with pH values of 7.4 and 5.0, respectively, for 24 h. Compared with that of free α -MG, the antioxidant activity of α -MG/GA NMs was more substantial. Furthermore, GA and α -MG had a synergistic antioxidant effect. The synergistic indexes (CI values) of DPPH and ABTS⁺ radical scavenging were 0.62 and 0.58, respectively. The α -MG/GA NMs prepared in this study improved the solubility and antioxidant activity of α -MG, providing a theoretical basis for applying α -MG in food, medicine, cosmetics, and other fields.

Key words: α -mangostin; glycyrrhizic acid; nanomicelles; solubility; antioxidant

α -倒捻子素 (α -Mangostin, α -MG) 是山竹果皮 (*Garcinia mangostana* L.) 中的氧杂蒽酮类化合物, 具有抑真菌、抑制皮肤中明胶酶、抗炎、抗癌、抗氧化等生物活性^[1-3], 受到食品、化妆品、药品等领域的重要关注。但其脂溶性强, 几乎不溶于水^[4], 生物利用度低^[5], 这些缺点限制了它的应用。近年来有研究应用脂质体、纳米粒、微球等纳米技术改善 α -MG 成药性, 尚存在制备工艺繁琐、有机溶剂安全性等问题^[6]。因此寻找一种简单, 安全的方法提高 α -MG 在水中的溶解度具有重要意义。

纳米胶束 (Nanomicelles, NMs) 是两亲性物质在水相环境中自组装形成的聚集体^[7], 其内核包载大量疏水性药物, 极大地提高了药物溶解性, 同时亲水性外壳能使其维持良好的水溶性。纳米胶束的制备方法分为薄膜水化法、透析法、直接溶解法等, 其中直接溶解法具有工艺简单、快速、易于放大的优点。甘草酸 (Glycyrrhizic Acid, GA) 是来源于植物光果甘草 (*Glycyrrhiza glabra* L.) 的三贴皂苷类化合物, 具有类似于表面活性剂的两亲性, 亲水单元和疏水单元分别是葡萄糖醛酸残基和甘草酸残基, 能够在水中聚集自组装形成胶束^[8]。目前, 甘草酸自组装胶束已成功用于穿心莲内酯、紫杉醇、黄芩苷、丹参酮 II A 等难溶药物的增溶与递送^[9-12], 具有较好的生物相容性和安全性。另外, GA 具有抗炎、抗氧化活性, 其在与药物合用时可以发挥“药辅合一”的作用^[10], 故推测将 GA 作为 α -MG 的载体, 可以实现 α -MG 溶解度和抗氧化活性的双效提高。基于此, 本研究采用直接溶解法制备 α -MG/GA NMs, 以期提高 α -MG 溶解度和抗氧化活性, 为 α -MG

在各领域的应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

α -倒捻子素标准品 (质量分数 $\geq 98\%$), 南京普怡生物科技有限公司; α -倒捻子素原料药 (质量分数 $\geq 90\%$), 南京普怡生物科技有限公司; 甘草酸 (质量分数 $\geq 80\%$), 南京普怡生物科技有限公司; 无水乙醇 (分析纯), 朝阳赫成化学试剂有限公司; 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH), 东京化成工业株式会社; 2,2'-联氮双(3-乙基苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐 (ABTS), 赛默飞世尔科技公司; 纯净水, 杭州娃哈哈集团有限公司。

1.2 仪器与设备

AB135-S 型十万分之一天平, 梅特勒-托利多有限公司; MS-H280-Pro 型磁力搅拌器, 大龙兴创实验仪器股份公司; H1650R 型高速离心机, 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司; XW-18D 型涡旋混合器, 绍兴市苏珀仪器有限公司; SB-5200 型超声波清洗机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; Cary 8454 型紫外分光光度计, 安捷伦科技有限公司; FDU-2110 型冷冻干燥机, 东京理化器械; SU 8020 型场发射扫描电子显微镜, 日立科学仪器有限公司; Zetasizer Nano ZS90 型激光粒度仪, 英国马尔文公司; Perkin-Elmer 型傅里叶变换红外光谱仪, 珀金埃尔默仪器有限公司; Multiskan Go 型全波长酶标仪, 赛默飞世尔科技有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 α -MG测定方法及线性关系考察

采用UV法测定。取 α -MG对照品约10.00 mg,精密称定,置于10 mL容量瓶中,添加无水乙醇溶解并定容至刻度线,摇匀,制得质量浓度为1.00 mg/mL的对照品储备液。将对照品储备液稀释为一系列质量浓度的 α -MG溶液,0.45 μ m微孔滤膜滤过。在317 nm处测定吸光度,以 α -MG浓度(x)为横坐标,吸光度(y)为纵坐标,绘制标准工作曲线如图1所示,线性回归方程为 $y=0.053 8x+0.012 2$, $R^2=0.999 7$ 。说明 α -MG在2~18 μ g/mL范围内线性良好。

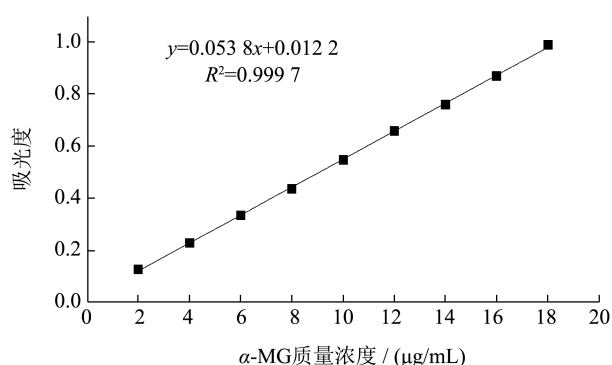


图1 α -MG标准工作曲线

Fig.1 Standard curve of α -MG

1.3.2 α -MG/GA NMs的制备及测定

取过量的 α -MG粉末与一定质量GA粉末分散于水中,置于磁力搅拌器上搅拌,10 000 r/min离心10 min,取上清液经0.45 μ m微孔滤膜滤过,即得到澄清透明的胶束溶液^[13]。

将胶束溶液以无水乙醇稀释一定倍数并用0.45 μ m微孔滤膜滤过,测定317 nm处的吸光度,计算 α -MG溶解度。

1.3.3 单因素试验

按照“1.3.2”中所述的制备方法,以 α -MG溶解度为指标,选用不同的GA质量分数(0.1%、0.2%、0.5%、0.8%、1.0%)、搅拌温度(30、40、50、60、70 $^{\circ}$ C)、搅拌时间(15、30、45、60、120 min)、搅拌速度(100、200、300、400、500 r/min)进行实验,考察不同因素对 α -MG溶解度的影响,选出最佳制备条件。在研究其中某一单因素变量的影响时,固定其他各因素条件:GA质量分数1.0%、搅拌温度40 $^{\circ}$ C、搅拌时间30 min、搅拌速度300 r/min。平行试验3次。

1.3.4 响应面试验

依据“1.3.3”中实验结果划定各因素水平并对响应面试验进行设计,采用Box-Behnken,以 α -MG溶解度为响应值,对 α -MG/GA NMs的制备工艺进一步优化,响应面试验因素水平表如表1所示。

表1 响应面试验因素水平表

Table 1 Response surface test factor level table

| 水平 | A | B | C |
|----|----------|--------------|----------|
| | GA质量分数/% | 搅拌速度/(r/min) | 搅拌时间/min |
| -1 | 0.8 | 200 | 15 |
| 0 | 1.0 | 300 | 30 |
| 1 | 1.2 | 400 | 45 |

1.3.5 α -MG/GA NMs的表征

1.3.5.1 粒径、多分散系数与Zeta电位测定

取适量 α -MG/GA NMs,加水稀释后置于比色皿中,用激光粒度仪测定其粒径、多分散系数与Zeta电位。

1.3.5.2 微观形态观察

按照最佳处方工艺制备 α -MG/GA NMs,10 000 r/min离心5 min取上清液,磷钨酸进行负染,透射电镜下观察其形态;将 α -MG/GA NMs冷冻干燥,采用真空喷镀法对 α -MG/GA NMs冻干粉进行喷金处理,完成后在扫描电镜下观察其形态。

1.3.5.3 红外光谱(FT-IR)分析

采用KBr压片法^[14],取GA粉末、 α -MG粉末、 α -MG/GA NMs冷冻干燥后的粉末以及同比例的 α -MG/GA物理混合物粉末,分别与干燥的KBr细粉混合研磨均匀后用压片机制成均匀的薄片,在4 000~500 cm^{-1} 波长范围测定其红外吸收光谱。

1.3.5.4 稳定性考察

取 α -MG/GA NMs冷冻干燥后的粉末置于培养皿中,摊成 ≤ 5 mm厚的薄层。分别在室温,(4 500 \pm 500) lx照度下;60 $^{\circ}$ C下及25 $^{\circ}$ C,相对湿度(75% \pm 5%)下放置10 d,于0、5、10 d取样复溶检测粒径与 α -MG保留率。

1.3.6 体外释放度的测定

在参考文献^[15]和预实验的基础上,采用透析法考察 α -MG/GA NMs中 α -MG的释放行为。分别取1 mL α -MG溶液(对照)和1 mL α -MG/GA NMs溶液,置透析袋(截留分子量为8 000~14 000 u),两端夹紧,完全浸没于20 mL PBS中(含体积分数为30%的乙醇,pH值7.4、5.0)。在37 $^{\circ}$ C、110 r/min条

件下振摇,分别与0.5、1、2、4、6、8、10、12、24 h取出释放介质(同时补入同温等量的新鲜释放介质),平行3组。采用UV法测定每个时间点释放介质中的药量,绘制累积释放曲线。

1.3.7 抗氧化活性的测定

1.3.7.1 DPPH自由基清除活性

根据实验室的方法^[16],精密称取DPPH粉末5.00 mg,溶解于50 mL无水乙醇中,避光冷藏保存备用。实验组:在96孔板中加入100 μL DPPH溶液,100 μL不同质量浓度GA、α-MG、α-MG/GA NMs溶液(每个浓度设置4个复孔),37 °C下避光反应30 min,使用全波长酶标仪测定517 nm处吸光度;对照组:100 μL无水乙醇代替DPPH溶液,其他不变,测定吸光度;空白组:100 μL无水乙醇代替待测样品溶液,其他不变,测定吸光度。计算DPPH自由基清除率。

$$W_1 = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100\% \quad (1)$$

式中:

W_1 —DPPH自由基清除率, %;

A_0 —空白组的吸光度;

A_1 —实验组的吸光度;

A_2 —对照组的吸光度。

1.3.7.2 ABTS⁺自由基清除活性

根据实验室的方法^[16],将7 mmol/L ABTS⁺自由基溶液与2.45 mmol/L过硫酸钾溶液等比混合均匀,避光反应12 h,即得ABTS⁺自由基储备液。用体积分数为50%的乙醇稀释储备液,使其在734 nm处的吸光值达到0.700±0.002,即得ABTS⁺自由基工作液。实验组:在96孔板中加入100 μL ABTS⁺自由基溶液,100 μL不同质量浓度GA、α-MG、α-MG/GA NMs溶液(每个质量浓度设置4个复孔),避光反应10 min,使用全波长酶标仪测定734 nm处的吸光度;对照组:100 μL无水乙醇代替ABTS⁺自由基溶液,其他不变,测定吸光度;空白组:100 μL无水乙醇代替待测样品溶液,其他不变,测定吸光度。计算ABTS⁺自由基清除率。

$$W_2 = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100\% \quad (2)$$

式中:

W_2 —ABTS⁺自由基清除率, %;

A_0 —空白组的吸光度;

A_1 —实验组的吸光度;

A_2 —对照组的吸光度。

1.3.7.3 CI值统计

参考相关文献^[17]的方法计算协同指数CI值:

$$CI = \frac{IC_{50Amix}}{IC_{50A}} + \frac{IC_{50Bmix}}{IC_{50B}} \quad (3)$$

式中:

IC_{50A} —α-MG单独作用时对应的 IC_{50} 值;

IC_{50B} —GA单独作用时对应的 IC_{50} 值;

IC_{50Amix} —α-MG和GA复合作用时α-MG对应的 IC_{50} 值;

IC_{50Bmix} —α-MG和GA复合作用时GA对应的 IC_{50} 值。

若 $CI=1$,表示两物质的相互作用为相加;若 $CI<1$,表示两物质相互作用的结果为协同作用,并且CI值越小表示协同作用越强;若 $CI>1$,表示相互作用为拮抗作用。

1.4 数据分析

所有试验均重复3次;使用Design-Expert.V 10.0.1.0和Origin 2022软件对试验数据进行分析并绘图。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 GA质量分数对α-MG溶解度的影响

由图2可知,α-MG的溶解度随着GA质量分数的增加而增加。当GA质量分数≤0.5%时,α-MG的溶解度缓慢增加;0.5% < GA质量分数 < 1.0%时,α-MG的溶解度迅速增加(从75.95 μg/mL增加到210.87 μg/mL);GA质量分数≥1.0%时,α-MG的溶解度增加缓慢。因GA质量分数的继续增大会使胶束溶液变为凝胶状态而影响α-MG溶解度的测定,故选择1.0%作为制备α-MG/GANMs的最佳GA质量分数。

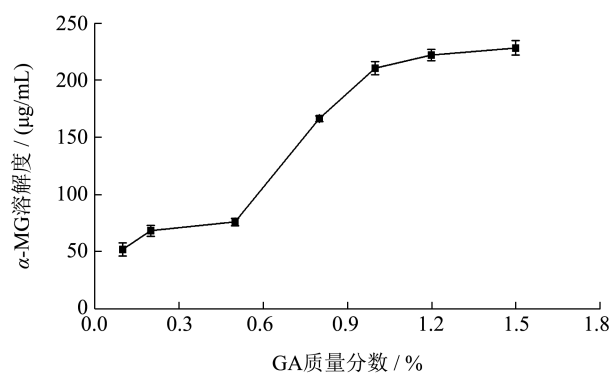
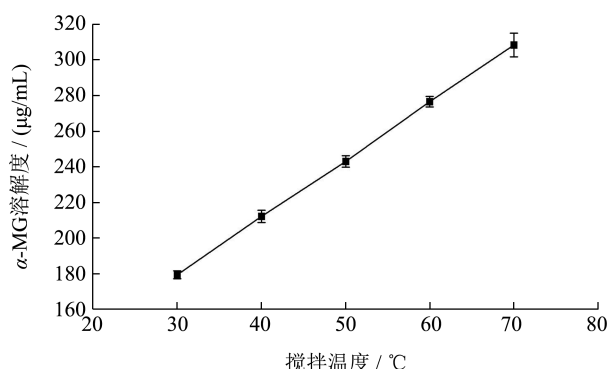


图2 不同GA质量分数下的α-MG溶解度

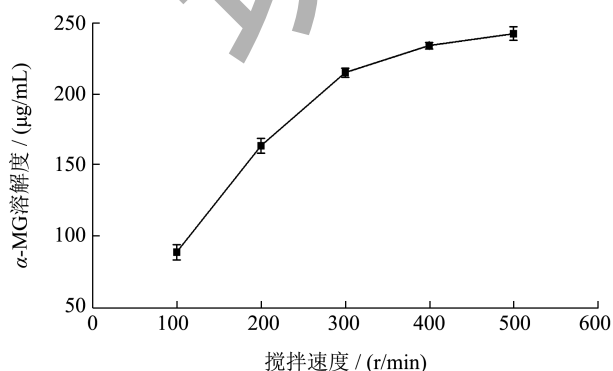
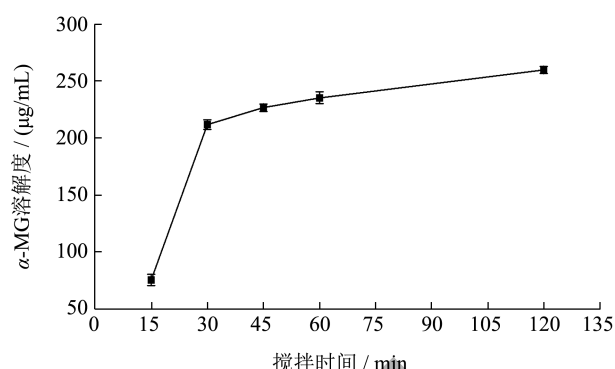
Fig.2 Solubility of α-MG in different mass fraction of GA

2.1.2 搅拌温度对 α -MG溶解度的影响图3 不同搅拌温度下的 α -MG溶解度Fig.3 Solubility of α -MG at different stirring temperatures

由图3可知,搅拌温度对 α -MG的溶解度影响较大, α -MG的溶解度随着搅拌温度的上升而增加,经线性拟合发现,二者有相应的线性关系,即 y (α -MG溶解度, $\mu\text{g/mL}$) = $3.21x$ (搅拌温度, $^{\circ}\text{C}$) + 83.39; $R^2=0.9998$ 。故可以预测,在实验考察温度范围内(30~70 $^{\circ}\text{C}$),每增加1 $^{\circ}\text{C}$,可使 α -MG的溶解度增加3.21 $\mu\text{g/mL}$ 。结果表明搅拌温度的上升能够促进GA胶束包含更多的 α -MG,因温度的升高可能会引起药物性质变化,且会导致水分子挥发而影响实验结果的准确性,故选择40 $^{\circ}\text{C}$ 作为制备 α -MG/GA NMs的最佳搅拌温度。

2.1.3 搅拌速度对 α -MG溶解度的影响

由图4可知,当搅拌速度 ≤ 300 r/min时, α -MG的溶解度呈迅速增加趋势(从88.26 $\mu\text{g/mL}$ 增加到214.88 $\mu\text{g/mL}$);但当搅拌速度 > 300 r/min时, α -MG的溶解度增加缓慢。这可能是因为剪切力的增加有利于GA自组装形成胶束,从而包含更多的 α -MG。在 α -MG的溶解度增加较少的情况下,考虑到能量消耗问题,选择300 r/min作为制备 α -MG/GA NMs的最佳搅拌速度。

图4 不同搅拌速度下的 α -MG溶解度Fig.4 Solubility of α -MG at different stirring speeds2.1.4 搅拌时间对 α -MG溶解度的影响图5 不同搅拌时间下的 α -MG溶解度Fig.5 Solubility of α -MG at different stirring time

由图5可知,搅拌时间从15 min增加到30 min, α -MG的溶解度提高了136.47 $\mu\text{g/mL}$,但当搅拌时间 > 30 min时, α -MG的溶解度增加缓慢,表明适当地增加搅拌时间有利于GA胶束包含 α -MG。在 α -MG的溶解度增加较少的情况下,考虑到时间成本,选择30 min作为制备 α -MG/GA NMs的最佳搅拌时间。

2.2 响应面试验

采用Design-Expert 10.0.1.0对表2数据进行处理与分析,得到回归方程: $Y=220.66+15.98A+11.48B+63.18C+8.15AB+11.69AC+1.62BC-21.40A^2-18.57B^2-57.45C^2$ 。模型的显著水平、失拟项(见表3)及校正决定系数均表明该拟合成立。由表3可知,各因素对 α -MG溶解度的影响显著性排序为:搅拌时间(C) $>$ GA质量分数(A) $>$ 搅拌速度(B);另外,本研究所建立的数学模型中GA质量分数(A)与搅拌时间(C)之间的交互影响显著,但GA质量分数(A)与搅拌速度(B)、搅拌速度(B)与搅拌时间(C)之间的交互影响不显著。

2.3 α -MG/GA NMs最佳制备工艺的确定及验证

该实验的响应曲面如图6所示。优化目标条如下:GA质量分数为0.8%~1.2%,搅拌速度为200~400 r/min,搅拌时间为15~45 min, α -MG溶解度为最大值。优化得到的最佳工艺为GA质量分数1.062%、搅拌速度331.7 r/min、搅拌时间32.912 min。鉴于实际操作的局限性,确定最佳制备工艺为GA质量分数1.0%、搅拌温度40 $^{\circ}\text{C}$ 、搅拌速度331 r/min、搅拌时间33 min在此条件下, α -MG溶解度的预测值为237.04 $\mu\text{g/mL}$,验证值为232.65 $\mu\text{g/mL}$,与预测值较接近。

表 2 响应面试验设计与结果

Table 2 Design and results of response surface test

| 编号 | 因素 | | | α -MG 溶解度 /($\mu\text{g/mL}$) |
|----|--------------|-----------------|-------------|--|
| | A: GA 质量分数/% | B: 搅拌速度/(r/min) | C: 搅拌时间/min | |
| 1 | 1 | 300 | 30 | 210.87 \pm 2.56 |
| 2 | 1 | 400 | 45 | 220.43 \pm 2.85 |
| 3 | 0.8 | 200 | 30 | 154.85 \pm 1.61 |
| 4 | 0.8 | 300 | 45 | 174.71 \pm 0.87 |
| 5 | 1 | 300 | 30 | 223.29 \pm 2.83 |
| 6 | 1 | 300 | 30 | 227.02 \pm 4.32 |
| 7 | 1 | 200 | 45 | 203.86 \pm 2.64 |
| 8 | 1 | 200 | 15 | 72.08 \pm 1.75 |
| 9 | 1.2 | 300 | 15 | 85.55 \pm 1.67 |
| 10 | 1.2 | 200 | 30 | 173.93 \pm 3.65 |
| 11 | 1.2 | 400 | 30 | 222.82 \pm 4.02 |
| 12 | 1 | 300 | 30 | 221.28 \pm 4.70 |
| 13 | 1 | 300 | 30 | 220.83 \pm 4.04 |
| 14 | 1 | 400 | 15 | 82.18 \pm 2.23 |
| 15 | 0.8 | 300 | 15 | 80.39 \pm 3.31 |
| 16 | 0.8 | 400 | 30 | 171.15 \pm 4.75 |
| 17 | 1.2 | 300 | 45 | 226.61 \pm 6.28 |

表 3 二次回归方程的方差分析

Table 3 Analysis of variance of quadratic regression equation

| 方差来源 | 偏差平方和 | 自由度 | 均方差 | F 值 | P 值 | 显著性 |
|----------------|-----------|-----|-----------|--------|----------|-----|
| 模型 | 54 493.34 | 9 | 6 054.82 | 84.33 | <0.000 1 | ** |
| A | 2 041.92 | 1 | 2 041.92 | 28.44 | 0.001 1 | ** |
| B | 1 054.78 | 1 | 1 054.78 | 14.69 | 0.006 4 | ** |
| C | 31 929.91 | 1 | 31 929.91 | 444.7 | <0.000 1 | ** |
| AB | 265.53 | 1 | 265.53 | 3.7 | 0.095 9 | |
| AC | 546.16 | 1 | 546.16 | 7.61 | 0.028 2 | * |
| BC | 10.47 | 1 | 10.47 | 0.15 | 0.714 | |
| A ² | 1 927.62 | 1 | 1 927.62 | 26.85 | 0.001 3 | ** |
| B ² | 1 452.6 | 1 | 1 452.6 | 20.23 | 0.002 8 | ** |
| C ² | 13 895.16 | 1 | 13 895.16 | 193.52 | <0.000 1 | ** |
| 残差 | 502.6 | 7 | 71.8 | | | |
| 失拟检验 | 358.98 | 3 | 119.66 | 3.33 | 0.137 6 | |
| 纯误差 | 143.62 | 4 | 35.91 | | | |
| 总误差 | 54 995.94 | 16 | | | | |

注: ** ($P < 0.01$) 极显著; * ($0.01 < P < 0.05$) 显著。

Pham 等^[15]制备的 α -MG 交联蚕丝蛋白纳米粒使 α -MG 溶解度从 0.39 $\mu\text{g/mL}$ 增加至 1.09 $\mu\text{g/mL}$, 提高了近 3 倍; Aisha 等^[18]用聚乙烯吡咯烷酮通过溶剂蒸发法制备了 α -MG 固体分散体, 使 α -MG 溶解度从 0.20 $\mu\text{g/mL}$ 增加至 2 743.00 $\mu\text{g/mL}$, 提高了 13 715 倍, 但存在制备工艺繁琐、有机溶剂安全性等问题。本研究制备的 α -MG/GA NMs 中 α -MG 溶解度为 232.65 $\mu\text{g/mL}$, 比水中溶解度^[18]大了近 1 163 倍, 且制备工艺简单安全。

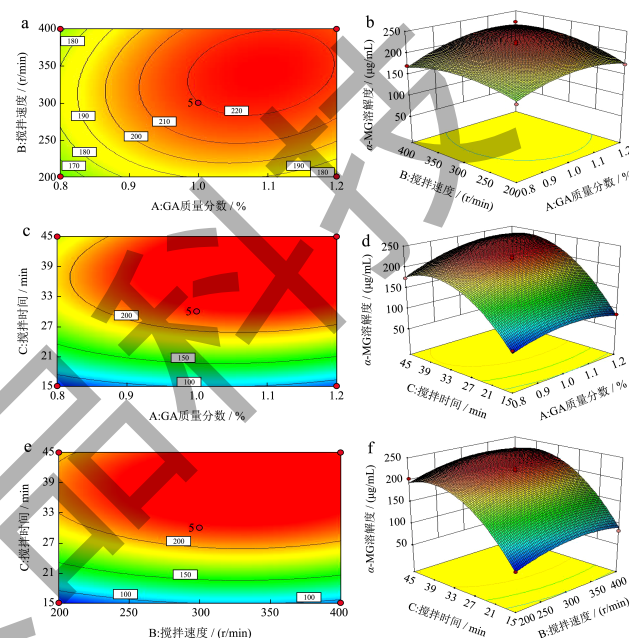


图 6 GA 质量分数、搅拌速度、搅拌时间的 3D 响应面优化图和等高线图

Fig.6 3D response surface optimization diagram and contour diagram of GA mass fraction, agitation speed and agitation time

注: a 和 b: GA 质量分数和搅拌速度; c 和 d: GA 质量分数和搅拌时间; e 和 f: 搅拌速度和搅拌时间。

2.4 α -MG/GA NMs 的表征

2.4.1 粒径、多分散系数及 Zeta 电位测定

经测定, α -MG/GA NMs 粒径在 60~300 nm 范围, 平均粒径为 123.46 nm, PDI 为 0.24, Zeta 电位为 -20.94 mV。GA 的平均粒径为 98.75 nm, PDI 为 0.24, Zeta 电位为 -6.80 mV。GA 空白胶束包载 α -MG 后粒径变大, Zeta 电位绝对值变大。

2.4.2 微观形态观察

TEM 结果如图 7 所示, α -MG/GA NMs 为球状或类球状, 粒径在 50~100 nm 范围, 小于激光粒度仪的测定结果, 可能是由于透射电镜是在干燥状态

下测定的。SEM 结果如图 8 所示， α -MG/GA NMs 为类球状，且有聚集现象，推测是冻干过程中发生了胶束聚集。

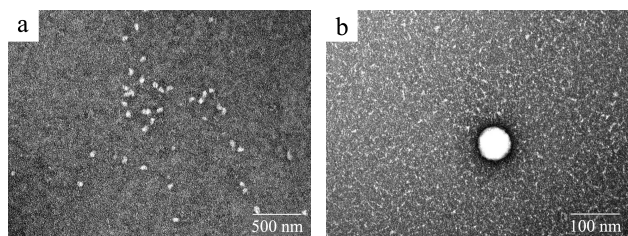


图 7 α -MG/GA NMs 的 TEM 图

Fig.7 TEM images of α -MG/GA NMs

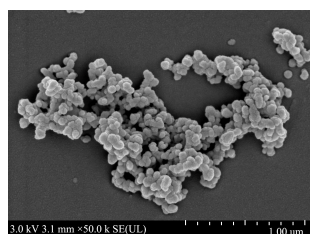


图 8 α -MG/GA NMs 的 SEM 图

Fig.8 SEM images of α -MG/GA NMs

2.4.3 红外 (FT-IR) 光谱分析

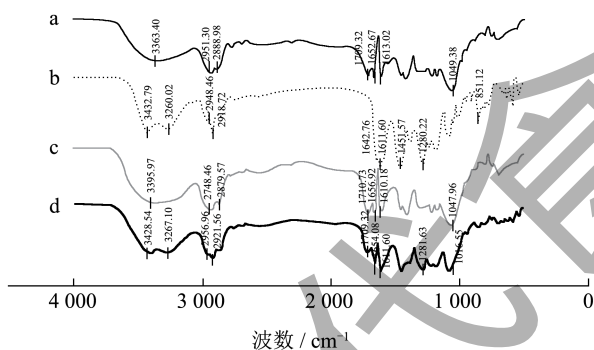


图 9 α -MG/GA NMs 的 FT-IR 光谱

Fig.9 FT-IR spectrum of α -MG/GA NMs

注: a 为 GA ; b 为 α -MG ; c 为 α -MG/GA NMs ; d 为 α -MG/GA 物理混合物。

α -MG/GA NMs 的 FT-IR 光谱如图 9 所示，经分析，GA 特征吸收峰主要有： $3\ 410\ \text{cm}^{-1}$ （羧基中 -OH 伸缩振动峰值）、 $2\ 870\sim 2\ 960\ \text{cm}^{-1}$ （-CH₃ 伸缩振动峰值）、 $1\ 710\ \text{cm}^{-1}$ （C=O 伸缩振动峰值）、 $1\ 620\sim 1\ 680\ \text{cm}^{-1}$ （C=C 伸缩振动峰值）、 $1\ 035\ \text{cm}^{-1}$ （C-O 伸缩振动峰值）； α -MG 特征吸收峰主要有： $3\ 428\ \text{cm}^{-1}$ 、 $3\ 257\ \text{cm}^{-1}$ （-OH 伸缩振动峰值）、 $2\ 850\sim 2\ 960\ \text{cm}^{-1}$ （-CH₃ 伸缩振动峰值）、 $1\ 580\sim 1\ 650\ \text{cm}^{-1}$ 、 $1\ 450\ \text{cm}^{-1}$ （C=C 伸缩振动峰值）、 $1\ 280\ \text{cm}^{-1}$ （C-O-C 伸缩振动峰值）；物理混合物的吸收峰基本是 GA 和 α -MG 谱图的简单叠加， α -MG 的特征峰仍然存在； α -MG/GA NMs 基本

与 GA 的特征吸收一致，其中 α -MG 特征峰被掩盖，GA 与 α -MG 的羟基吸收峰均发生位移，表明 α -MG 可能被 GA 包裹， α -MG 的羟基与 GA 疏水单元中的羧基发生了氢键相互作用。

2.4.4 稳定性考察

光照、高温、高湿对 α -MG/GA NMs 粒径、 α -MG 保留率的影响如图 10、11 所示。不同条件下，10 d 内 α -MG/GA NMs 粒径变化在 $114.95\sim 136.60\ \text{nm}$ 之间， α -MG 保留率保持在 92% 以上，变化均不显著，说明 α -MG/GA NMs 冻干后稳定性良好。

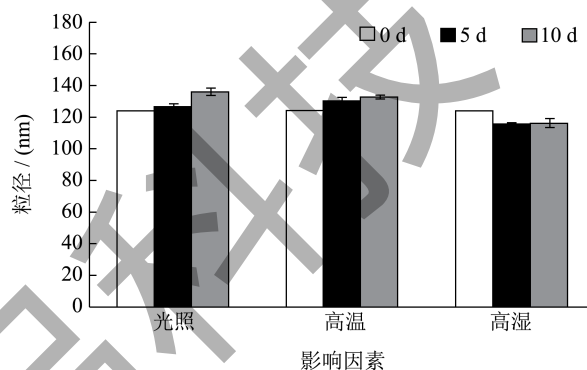


图 10 光照、高温、高湿对 α -MG/GA NMs 粒径的影响

Fig.10 Effects of light, high temperature and high humidity on the particle size of α -MG/GA NMs

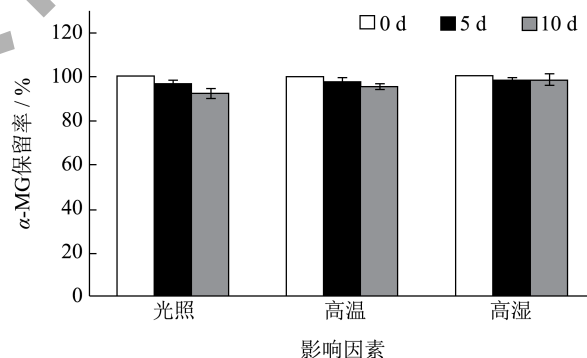


图 11 光照、高温、高湿对 α -MG/GA NMs 中 α -MG 保留率的影响

Fig.11 Effects of light, high temperature and high humidity on the retention rate of α -MG in α -MG/GA NMs

2.5 体外释放度的测定

游离 α -MG 和 α -MG/GA NMs 中 α -MG 在不同 pH 释放介质中的累积释放曲线如图 12 所示。 α -MG 在 pH 值 7.4、5.0 的释放介质中 24 h 仅释放出 19.58%、17.84%， α -MG/GA NMs 在 pH 值 7.4、5.0 的释放介质中 24 h 缓慢释放出 47.03%、40.56%， α -MG/GA NMs 中 α -MG 释放比游离 α -MG 释放快，且释

放量多, 具有显著性差异 ($P < 0.05$)。pH 值 7.4 条件下 α -MG 和 α -MG/GA NMs 中 α -MG 累积释放率均高于 pH 值 5.0 条件下的 α -MG 累积释放率, 但无显著性差异 ($P > 0.05$)。结果表明 α -MG/GA NMs 对 α -MG 的释放具有促进作用, 且 pH 对其释放影响不显著。对释药数据进行不同数学模型拟合, 以决定系数 (R^2) 最大的为最好拟合结果, 各组体外释放均与一级动力学模型拟合最好, 拟合方程和拟合度见表 4。

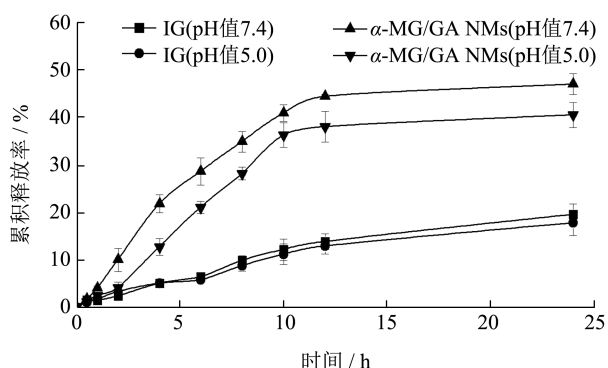


图 12 α -MG 和 α -MG/GA NMs 的累积释放曲线

Fig.12 Accumulative release curves of α -MG and α -MG/GA NMs

表 4 α -MG/GA NMs 释药模型的拟合方程

Table 4 Fitting equation of drug release model of α -MG/GA NMs

| 分组 | 拟合方程 | 相关系数 |
|-------------------------------|-------------------------|---------|
| α -MG(pH 值 7.4) | $Q=26.79(1-e^{-0.06t})$ | 0.988 4 |
| α -MG(pH 值 5.0) | $Q=23.39(1-e^{-0.06t})$ | 0.989 9 |
| α -MG/GA NMs(pH 值 7.4) | $Q=51.05(1-e^{-0.14t})$ | 0.987 3 |
| α -MG/GA NMs(pH 值 5.0) | $Q=47.38(1-e^{-0.11t})$ | 0.953 7 |

2.6 抗氧化活性的测定

图 13~16 分别是各样品对 DPPH、ABTS⁺ 自由基的清除能力。由图 13 和图 15 可知, α -MG/GA NMs 和游离 α -MG 对两种自由基的清除作用呈现相似的趋势, 且相同浓度下 α -MG/GA NMs 清除率更高。经计算, α -MG/GA NMs 和游离 α -MG 对 DPPH 自由基清除作用的 IC₅₀ 值分别为 53.37 μ g/mL、99.76 μ g/mL, 对 ABTS⁺ 自由基清除作用的 IC₅₀ 值分别为 6.17 μ g/mL、11.66 μ g/mL, α -MG/GA NMs 的抗氧化活性更强。由图 14 和 16 可知, GA 具有一定的抗氧化活性, 经计算, GA 对 DPPH、ABTS⁺ 自由基清除作用的 IC₅₀ 值分别为 18.09 mg/mL、2.58 mg/mL。另外, 根据表 5 数据计算出 GA、 α -MG 二者对 DPPH 自

由基清除作用的 CI 值为 0.62, 对 ABTS⁺ 自由基清除作用的 CI 值为 0.58, 均小于 1, 说明二者具有协同抗氧化作用。故推测, α -MG/GA NMs 的抗氧化活性更强可能是因为 GA 本身具有一定的抗氧化能力, 发挥了协同增效的作用, 或是因为 GA 的包合与分散作用, 使 α -MG 能更好地与自由基发生反应。

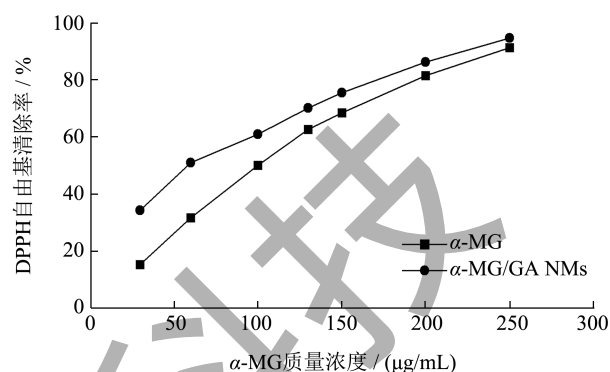


图 13 α -MG/GA NMs 对 DPPH 自由基的清除作用

Fig.13 Scavenging effect of solubilization system of α -MG/GA NMs on DPPH radical

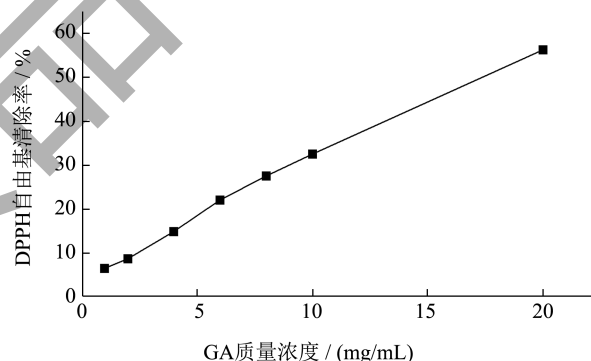


图 14 GA 对 DPPH 自由基的清除作用

Fig.14 Scavenging effect of solubilization system of GA on DPPH radical

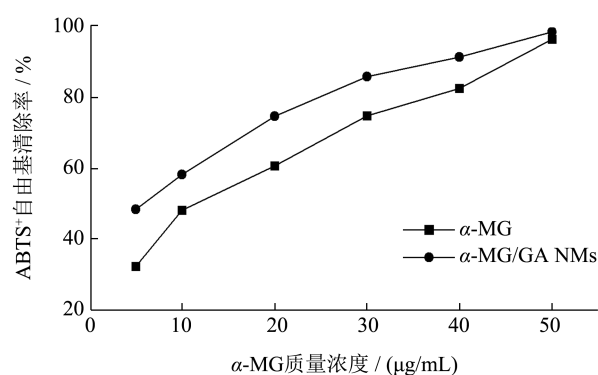
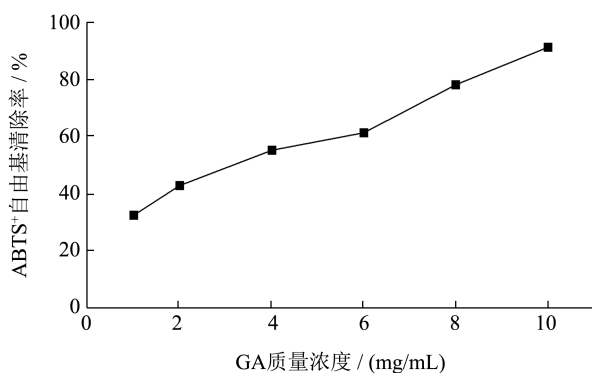


图 15 α -MG/GA NMs 对 ABTS⁺ 自由基的清除作用

Fig.15 Scavenging effect of solubilization system of α -MG/GA NMs on ABTS⁺ radical

图 16 GA 对 ABTS⁺ 自由基的清除作用Fig.16 Scavenging effect of solubilization system of GA on ABTS⁺ radical表 5 GA和 α -MG对DPPH、ABTS⁺自由基清除率统计分析结果Table 5 Statistical analysis results of DPPH、ABTS⁺ clearance rate by GA and α -MG

| 自由基 | 药物 | 单独作用 IC ₅₀ /(μ g/mL) | 复合作用 IC _{50mix} /(μ g/mL) | CI 值 |
|-------------------|--------------|---|--|------|
| DPPH | α -MG | 99.76 | 53.37 | 0.62 |
| | GA | 18 090.02 | 1 595.47 | |
| ABTS ⁺ | α -MG | 11.66 | 6.17 | 0.58 |
| | GA | 2 583.09 | 123.39 | |

3 结论

本研究以甘草酸为载体,通过甘草酸自组装成胶束包载 α -MG制备 α -MG/GA NMs。以 α -MG的溶解度为指标,通过单因素试验和响应面试验优化了 α -MG/GA NMs的制备工艺,在GA质量分数1.0%、搅拌温度40℃、搅拌速度331 r/min、搅拌时间33 min下制备的 α -MG/GA NMs中 α -MG溶解度为232.65 μ g/mL,显著提高了 α -MG的溶解度;粒径为123.46 nm、PDI为0.24、Zeta电位为-20.94 mV;微观形态为类球形; α -MG的羟基与GA疏水单元中的羧基发生了氢键相互作用; α -MG/GA NMs能够促进 α -MG的释放,且具有缓释效果;GA与 α -MG具有协同抗氧化作用, α -MG被GA包合后仍保持抗氧化能力,且略微增强。本研究成功制备了 α -MG/GA NMs,实现了 α -MG溶解度与抗氧化活性的双效提高,该制备工艺简单,安全,使放大生产具有可能性,为 α -MG的相关应用提供了研究基础。

参考文献

[1] TEJASHRI C, AARON M. The diverse bioactivity of α -Mangostin and its therapeutic implications [J]. Future Med Chem, 2021, 13: 1679-1694.

[2] WANG JJ, BARBARA J.S.S, ZHANG W. Significant anti-invasive activities of α -Mangostin from the mangosteen pericarp on two human skin cancer cell lines [J]. Anticancer Res, 2012, 32: 3805-3816.

[3] 陆原,陈文良,陈达灿.热带植物山竹提取物在皮肤科领域应用的研究进展[J].医学综述,2010,16(15):2352-2354.

[4] MANZAR A, SUMMYA R, KISA F, et al. Biochemical features and therapeutic potential of α -Mangostin: mechanism of action, medicinal values, and health benefits [J]. Biomed Pharmacother, 2023, 163: 114710.

[5] SARUNYA P, KUNAT S, SUVIMOL S, et al. Controllable encapsulation of α -Mangostin with quaternized β -cyclodextrin grafted chitosan using high shear mixing [J]. Int J Pharm, 2018, 538: 21-29.

[6] 李武超,郝武常,李范珠,等. α -倒捻子素新型给药系统研究进展[J].中国药业,2020,29(13):1-5.

[7] ABHIJIT S, JOZEF A, SREENATH B, et al. Fibrillar networks of Glycyrrhizic acid for hybrid nanomaterials with catalytic features [J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2015, 54: 5408-5412.

[8] MUZZAMAL H. Molecular dynamics simulations of Glycyrrhizic acid aggregates as drug-carriers for paclitaxel [J]. Current Drug Delivery, 2019, 16(7): 618-627.

[9] 杨富恒,李国锋,李振东,等.基于甘草酸为载体的紫杉醇-甘草酸纳米胶束的构建和口服生物利用度的评价[J].中国医院药学杂志,2018,38(10):1040-1044,1055.

[10] 刘帆.甘草酸自组装体系对中药单体成分的增溶促稳作用及其配伍机制研究[D].天津:天津中医药大学,2020.

[11] 李映,王莉芳,王金铃,等.穿心莲内酯-甘草酸纳米胶束的制备工艺研究[J].中国中药杂志,2018,43(1):79-85.

[12] 梁启凡,崔季维,张新茹,等.丹参酮II A-甘草酸自组装纳米胶束的制备及体外抗脑胶质瘤评价[J].南京中医药大学学报,2022,38(6):534-540.

[13] 王凡.甜菊糖苷对根皮素的增溶研究[D].南昌:南昌大学,2020.

[14] RENATA R, MONIKA S C, ARTUR Z, et al. Microencapsulated red powders from cornflower extract-spectral (FT-IR and FT-Raman) and antioxidant characteristics [J]. Molecules, 2022, 27(10): 3094.

[15] DUY T P, NUTTAWUT S, WAREE T. Alpha mangostin loaded crosslinked silk fibroin-based nanoparticles for cancer chemotherapy [J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2019, 181: 705-713.

[16] 张明欣,张余,张秀君,等.大豆提取物对光甘草定的增溶及其抗氧化活性研究[J].中兽药,2023,21(3):631-636.

[17] CHEN X, LI H, ZHANG B, et al. The synergistic and antagonistic antioxidant interactions of dietary phytochemical combinations [J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2022, 62(20): 5658-5677.

[18] ABDALRAHIM F A A, ZHARI I, KHALID M A S et al. Solid dispersions of α -Mangostin improve its aqueous solubility through self-assembly of nanomicelles [J]. J Pharm Sci, 2012, 101: 815-825.