DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2025.09.013

Box－Behnken响应面优化厚朴酚－分离乳清蛋白自组装纳米粒制备工艺及体外评价

邓鸿丹[1],张倩[1],刘芳[1],杨璐萍[1],吴学渊[2],张芮苑[1]
(1. 成都中医药大学药学院西南特色中药资源国家重点实验室,四川 成都 611137;
2. 成都农业科技职业学院,四川 成都 611130)

摘要:目的 运用Box－Behnken设计－效应面法优化厚朴酚－分离乳清蛋白自组装纳米粒(magnolol whey protein isolate nanoparticles,MAG－WPI－NPs)的制备工艺参数,对其进行制剂表征及抗氧化、抗菌作用评价。方法 采用去溶剂化法制备MAG－WPI－NPs,以包封率为评价指标,运用单因素结合Box－Behnken设计－效应面法优化其制备工艺参数,对优化出的MAG－WPI－NPs进行形貌、粒径、电位等理化性质表征,并评价其1,1－二苯基－2－三硝基苯肼(1,1－Diphenyl－2－picrylhydrazyl,DPPH)自由基清除能力、抑制大肠杆菌性能。结果 优化出的最佳制备工艺参数为反溶剂/溶剂体积比12∶1、乳清蛋白/厚朴酚投料比12∶1、探超时间1.5 min;所制得的MAG－WPI－NPs外观澄清、透明、微泛蓝光,透射电镜下观察纳米粒呈球形,平均粒径为(227.33±0.02)nm,ζ电位为(－23.6±0.02)mV,包封率为(98.57±0.46)%,载药量为(8.57±0.001)%,多分散指数(poly dispersity index,PDI)为(0.1369±0.26)%;MAG－WPI－NPs具有DPPH自由基清除作用、大肠杆菌抑制作用,且较游离药物作用强。结论 研究制备了一种天然食品级自组装MAG－WPI－NPs,该制剂制备方法简单、安全无毒,明显改善厚朴酚水溶性差、生物利用度低的缺点,为临床厚朴酚应用奠定制剂基础。

关键词:厚朴酚;分离乳清蛋白;Box－Behnken设计－效应面法;制备工艺筛选;抗氧化;抗大肠杆菌
中图分类号:R284.1 **文献标志码**:A **文章编号**:1673-7717(2025)09-0077-08

Box－Behnken Response Surface Optimization of Self－Assembled Magnolol Separated Whey Protein Nanoparticles Preparation Process and In Vitro Evaluation

DENG Hongdan[1],ZHANG Qian[1],LIU Fang[1],YANG Luping[1],WU Xueyuan[2],ZHANG Ruiyuan[1]
(1. State Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Resources with Southwest Characteristics,Chengdu University of Traditional Chinese Medicine,Chengdu 611137,Sichuan,China;
2. Chengdu Agricultural College,Chengdu 611130,Sichuan,China)

Abstract:*Objective* Using Box－Behnken design response surface methodology to optimize the preparation process parameters of magnolol whey protein isolate nanoparticles(MAG－WPI NPs),and to characterize their formulation and evaluate their antioxidant and antibacterial effects. *Methods* MAG－WPI－NPs were prepared using a desolvation method,with encapsulation efficiency as the evaluation index. The preparation process parameters were optimized using a single factor combined with Box－Behnken design response surface methodology. The optimized MAG－WPI－NPs were characterized by their morphology,particle size,potential and other physicochemical properties. The free radical scavenging ability of 1,1－diphenyl－2－trinitrophenylhydrazine(DPPH) and its ability to inhibit *Escherichia coli* were evaluated. *Results* The optimal preparation process parameters included a volume ratio of 12∶1 for anti solvent/solvent,a feed ratio of 12∶1 for whey protein/magnolol,and a probe time of 1.5 minutes. The prepared MAG－WPI－NPs had a clear,transparent and slightly bluish appearance. Under transmission electron microscopy,the nanoparticles appear spherical with an average particle size of (227.33±0.02) nm. The potential was (－23.6±0.02) mV,the encapsulation efficiency was (98.57±0.46)%,the drug loading was (8.57±0.001)%,and the polydispersity index(PDI) was (0.1369±0.26)%. MAG－WPI－NPs had DPPH radical scavenging effects,*Escherichia coli* inhibitory effects,and were more potent than free drugs. *Conclusion* This study prepared a natural food grade self－assembled MAG－WPI－NPs. The preparation method was simple,safe and non－toxic,significantly improving the poor water solubility and low bioavailability of magnolol and laying the foundation for the clinical application of magnolol.

Keywords:magnolol;whey protein isolate nanoparticles;Box－Behnken design－effect surface methodology;preparation process screening;antioxidant;anti *Escherichia coli*

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(81603300);四川省自然科学基金项目(2023NSFSC0661)
作者简介:邓鸿丹(2000－),女,四川绵阳人,硕士在读,研究方向:中药炮制与中药制剂。
通讯作者:刘芳(1986－),女,四川成都人,高级实验师,硕士研究生导师,研究方向:中药炮制与中药制剂。E-mail:bittercaffe1@126.com。

中药厚朴是木兰科植物厚朴 *Magnolia officinalis* Rehd. et Wils. 或凹叶厚朴 *M. officinalis* Rehd. et Wils. var. *biloba* Rehd. et Wils. 的干燥干皮、根皮及枝皮，具有下气除满、燥湿消痰之功[1]，被广泛用于临床。厚朴酚（magnolol，MAG）是厚朴主要有效成分之一，具有抗菌、抗炎、抗氧化、抗肿瘤等多种药理活性[2]，但 MAG 系疏水性联苯酚类化合物[3]，难溶于水，水中溶解度仅为 11.6 μg·mL^{-1}，限制了其在疾病防控中的应用。目前，厚朴酚常被制备成固体分散体[4]、固体脂质体纳米粒[5]、脂质体[6]等剂型以提高其生物利用度。

随着纳米技术的兴起，自组装纳米粒（self - assembled nanoparticle，SAN）因其对疏水性药物包封率高、药物泄漏少，且通过分子间非共价键形成的纳米微粒粒径小、结构稳定等优点[7]，已成为目前研究热点之一[8]。近年来，以蛋白作为 SAN 载体的纳米载药技术为难溶性药物递送提供了一系列研发策略，能有效提高药物生物利用度[9]。分离乳清蛋白（whey protein isolates，WPI）作为一种天然自组装动物蛋白[10]，营养价值高、易于消化并表现出良好的生物相容性和功能特性[11]，被广泛用作载体材料。与其他蛋白质相比，WPI 还具有良好的乳化性能，以 WPI 为载体包封疏水性化合物形成的纳米粒，具有更小的粒径、更高的包封率、稳定性和物理化学性质等[12]。本研究利用 WPI 的药理活性和结构特性优势，将 MAG 结合到 WPI 的疏水区域，无需引入其他交联剂或有毒试剂，制备厚朴酚 - 分离乳清蛋白自组装纳米粒（magnolol - whey isolated protein - nanoparticles，MAG - WPI - NPs），通过 Box - Behnken 设计 - 效应面法筛选提供了一种简单安全的处方工艺，制备出包封率较高、水溶性好的天然食品级 MAG - WPI - NPs，以提高厚朴酚生物利用度，并利用 WPI 载体的药辅合一特性，实现协同增效作用，为临床上广泛开发应用难溶性药物 MAG 奠定基础。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Essentia LC - 16 高效液相色谱仪和 Prominence - i LC - 2030C 3D（日本 SHIMADZU 公司）；CPA225D 型电子天平（美国奥豪斯仪器有限公司）；Spectra MAX Plus384 型酶标仪（美谷分子仪器有限公司）；UPH - Ⅱ - 10T 型优普超纯水制造系统（成都超纯科技有限公司）；JEM - 1400plus 型透射电子显微镜（日本电子株式会社）；WH620 型加热磁力搅拌器（WIGGENS 公司）；SCIENTZ - 10N 真空冷冻干燥机（宁波新芝生物科技股份有限公司）；Biosafer900 - 92 型超声波细胞破碎仪（南京赛飞生物科技有限公司）；SCIENTZ - 10N 型冷冻干燥机（宁波新芝生物科技股份有限公司）；Nano Brook 90 Plus-PALS 粒度仪（美国 Brookhaven 公司）；HT7800 型透射电子显微镜（日立公司）。

1.2 试剂与试药

厚朴酚（纯度：98%，成都德思特生物技术有限公司，批号 P1936050）；厚朴酚对照品（纯度：98%，成都德思特生物技术有限公司，批号 DST200701 - 035）；分离乳清蛋白（纯度：80%，上海源叶生物科技有限公司，批号 SO9HS193941）；DPPH（纯度：80%，西安道生化工科技有限公司，批号 R051727），临床分离大肠杆菌由成都农业科技职业学院实验室提供，乙腈和甲醇为 HPLC 级，无水乙醇为 AR 级，购自成都科隆化学品有限公司。

2 方法与结果

2.1 MAG - WPI - NPs 的制备

参考 ZHOU 等[13]报道的去溶剂化法制备 MAG - WPI - NPs。称取 48 mg 分离乳清蛋白超声溶于 16 mL 超纯水中，完全溶解后冰箱放置过夜以充分水化，为反溶剂相；将 4 mg 厚朴酚充分溶于 1 mL 无水乙醇中，为溶剂相。在缓慢搅拌的同时，使用注射器将厚朴酚乙醇溶液以 1 mL·min^{-1} 的速率缓慢滴入分离乳清蛋白溶液中，恒温磁力搅拌至乙醇完全除去后，在探针超声仪上匀化（功率 900 W，振幅 10%，开 2 s、关 3 s，循环 2 min），最后过 0.22 μm 微孔滤膜以分离游离厚朴酚，即得 MAG - WPI - NPs 溶液。同法制备未载厚朴酚的空白 WPI - NPs。

2.2 包封率、载药量的测定

2.2.1 包封率的测定 厚朴酚难溶于水，未包封的厚朴酚常以游离药物的形式存在于纳米制剂中，故通过滤过的方式除去游离厚朴酚。具体操作方法为取过膜前 MAG - WPI - NPs 共 100 μL，加入 900 μL 甲醇超声 30 min 破坏纳米粒，采用 HPLC 测得的药物质量浓度为加入药物总量（W_t）；取过 0.22 μm 微孔滤膜后的 MAG - WPI - NPs 溶液 100 μL，同上法处理后测得的质量浓度为被包封药物的量（W_e），包封率按下列公式求得。

$$包封率 = W_e / W_t$$

2.2.2 载药量的测定 将 MAG - WPI - NPs 溶液冷冻干燥成粉末后，储存于干燥器中备用。取 MAG - WPI - NPs 冻干粉（$W_{总}$）适量，加入甲醇超声破坏纳米粒，冷却后加甲醇定容，采用 HPLC 测得的质量浓度为冻干粉中药物的量（$W_{药}$），载药量按下列公式求得。

$$载药量 = W_{药} / W_{总}$$

2.2.3 厚朴酚 HPLC 含量测定 （1）色谱条件：色谱柱为 Hypersil GOLD 5UM 柱（250 mm × 4.6 mm，5 μm）；流动相为甲醇 - 水 - 乙腈（50∶20∶30）；检测波长 294 nm；柱温 30 ℃；进样体积 10 μL；保留时间 15 min；体积流量为 1.0 mL/min。

（2）对照品溶液的制备：取厚朴酚对照品 2.00 mg，精密称定，置于容量瓶中，用甲醇溶解并稀释至刻度线，摇匀，0.22 μm 微孔滤膜滤过，即得质量浓度为 1 mg/mL 的厚朴酚对照品母液。

（3）供试品溶液的制备：取 MAG - WPI - NPs 溶液 100 μL，加入 900 μL 甲醇超声 30 min 以破坏纳米粒，过 0.22 μm 微孔滤膜，即得供试品溶液，空白溶液同法制备。

（4）方法学考察：①专属性考察：分别取空白 WPI - NPs 供试品溶液、MAG - WPI - NPs 供试品溶液和厚朴酚对照品溶液按 2.2.3（1）项下色谱条件进行测定，色谱图见图 1。结果空白 WPI - NPs 供试品溶液未出现干扰峰，且厚朴酚色谱峰峰型良好，供试品与对照品溶液出峰时间一致，表明该色谱方法专属性良好。

②线性关系考察：精密吸取 2.2.3（2）项下配制的对照品溶液适量，用甲醇稀释配制成质量浓度分别为 1000、500、250、125、62.50、31.25、15.63 μg/mL 一系列对照品溶液，按 2.2.3（1）项下色谱条件进行测定，记录峰面积。以对照品溶液质量浓度为横坐标（X），对应的峰面积为纵坐标（Y），得厚朴酚线性回归方程 Y = 12 578X - 65 027，R^2 = 0.999 1，表明厚朴酚在 15.63 ~ 1000 μg/mL 线性关系良好。

③精密度实验：取质量浓度为 125 μg/mL 的对照品溶液，连续测定 6 次，厚朴酚峰面积的 RSD 为 0.04%，表明仪器精密度良好。

④重复性实验：按 2.2.3（3）项下方法平行制得 6 份供试品溶液，再按 2.2.3（1）项下色谱条件进样分析，结果显示厚朴酚质量分数的 RSD 为 0.07%，表明该方法重复性良好。

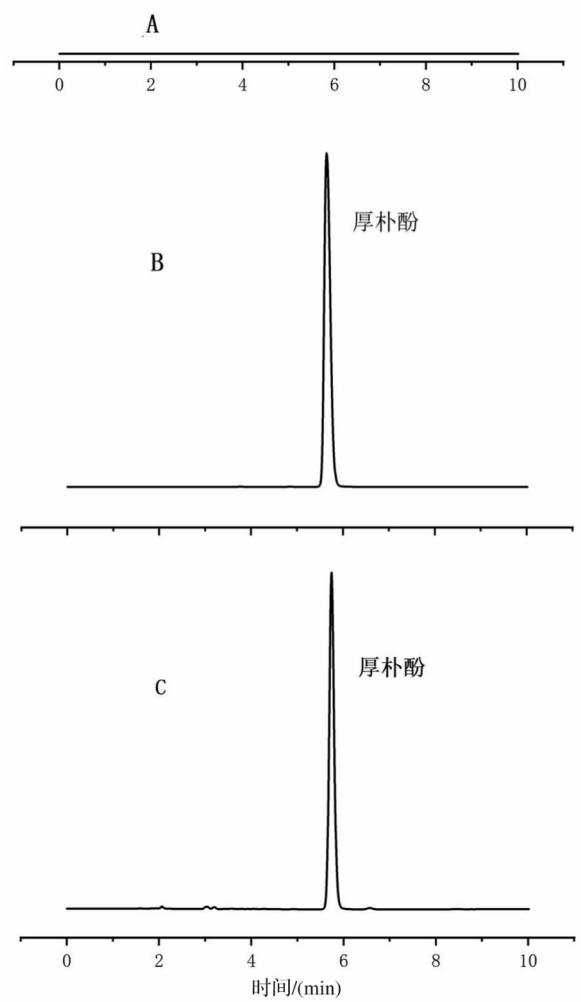


图 1 空白 WPI – NPs 溶液(A)、MAG 对照品溶液(B)和 MAG – WPI – NPs 供试品溶液(C)的 HPLC 图

⑤稳定性实验:取 2.2.3.4 项下供试品溶液适量,在室温下放置 0、6、12、24、48 h,按 2.2.3.1 项下色谱条件进样测定厚朴酚含量,计算厚朴酚峰面积 RSD 为 0.13%,结果显示供试品溶液在 48 h 内稳定性良好。

⑥加样回收率实验:取 2.2.3(3)项下供试品溶液适量,分别加入浓度为 15.63、125、500 μg/mL 厚朴酚对照品溶液,按 2.2.3(1)项下色谱条件进样测定,计算厚朴酚的加样回收率,结果显示厚朴酚的平均回收率为 99.26%,RSD 为 0.59%,可见本实验回收率良好。

2.3 单因素实验考察 MAG – WPI – NPs 制备工艺

2.3.1 *反溶剂/溶剂体积比* 根据前期预实验结果,首先固定分离乳清蛋白/厚朴酚投料比 10∶1,磁搅转速 400 r/min、探超(45 W、2 min)。考察反溶剂/溶剂体积比为 4∶1、8∶1、12∶1、16∶1、20∶1 时对 MAG – WPI – NPs 包封率和粒径的影响,结果见表 1。由表 1 可知,当反溶剂/溶剂体积比小于 4∶1 时,体系中含有较大比例的乙醇,包封率较低;随着反溶剂/溶剂体积比增加至 8∶1 及以上时,包封率显著增大;当反溶剂/溶剂比超过 16∶1 时,体系中较低的乙醇含量不能提供足够的去溶剂化能,即无法较好地排出蛋白结合空腔中的水使更多的厚朴酚进入其内,故包封率出现降低。本实验结果表明,反溶剂/溶剂体积比对 MAG – WPI – NPs 包封率影响较大,选择反溶剂/溶剂体积比为 8∶1 ~ 16∶1 进行后续 Box – Behnken 设计优化实验。

表 1 反溶剂/溶剂体积比考察 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

反溶剂/溶剂体积比	包封率/(%)	粒径/(nm)
4∶1	47.05 ±0.06	241.86 ±0.01
8∶1	76.38 ±0.32	248.43 ±0.02
12∶1	86.38 ±0.03	274.37 ±0.01
16∶1	81.97 ±0.02	287.00 ±0.02
20∶1	78.99 ±0.01	288.87 ±0.02

2.3.2 *分离乳清蛋白/厚朴酚投料比* 固定反溶剂/溶剂体积比 12∶1、磁搅转速为 400 r/min、探超(45 W、2 min)。考察分离乳清蛋白/厚朴酚投料比为 6∶1、8∶1、10∶1、12∶1、14∶1 对 MAG – WPI – NPs 包封率和粒径的影响,结果见表 2。随着分离乳清蛋白/厚朴酚投料比不断增大,纳米粒包封率呈增加的趋势,粒径无明显变化。当投料比为 12∶1 ~ 16∶1 时,纳米粒包封率趋向平稳,包封率在 91.01% ~92.50%,但粒径逐渐变大,同时考虑到乳清蛋白/厚朴酚投料比影响纳米粒的载药量,故选择乳清蛋白/厚朴酚投料比为 10∶1 ~ 14∶1 进行后续 Box – Behnken 设计优化实验。

表 2 分离乳清蛋白/厚朴酚投料比考察($n=3, \bar{x} \pm s$)

分离乳清蛋白/厚朴酚投料比	包封率/(%)	粒径/(nm)
8∶1	53.63 ±0.03	248.80 ±0.04
10∶1	58.73 ±0.00	275.63 ±0.02
12∶1	92.50 ±0.05	260.57 ±0.03
14∶1	92.61 ±0.89	290.57 ±0.01
16∶1	91.01 ±0.04	359.93 ±0.03

2.3.3 *探超时间* 固定反溶剂/溶剂体积比 12∶1、分离乳清蛋白/厚朴酚投料比 10∶1、磁搅转速 400 r/min、探超功率为 45 W。考察探超时间 0、1、3、5、7 min 对 MAG – WPI – NPs 包封率和粒径的影响,结果见表 3。探超 1 min 与不超声相比,包封率略降低,粒径因为超声强烈的剪切作用而变小;但探超 3 min 时,较长的探超时间破坏了纳米体系的稳定性使药物泄漏,导致包封率明显降低,故选择探超时间 0 ~ 3 min 进行进一步优化。

表 3 探超时间考察 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

探超时间/(min)	包封率/(%)	粒径/(nm)
0	92.53 ±0.08	380.80 ±0.09
1	99.67 ±0.11	276.43 ±0.04
3	91.15 ±0.02	262.57 ±0.71
5	91.20 ±0.08	239.60 ±0.02
7	91.11 ±0.02	239.27 ±0.01

2.3.4 *磁搅转速* 固定反溶剂/溶剂体积比 12∶1、分离乳清蛋白/厚朴酚投料比 10∶1、探超(45 W、2 min)。考察磁搅转速 200、400、600、800 $r \cdot min^{-1}$ 对 MAG – WPI – NPs 包封率和粒径的影响,结果见表 4。磁搅转速对包封率和粒径影响相对较小,故选择磁搅速度为 400 r/min。

表 4 磁搅转速考察($n=3, \bar{x} \pm s$)

磁搅转速/(r/min)	包封率/(%)	粒径/(nm)
200	93.21 ±0.03	269.97 ±0.01
400	95.51 ±0.04	262.53 ±0.05
600	94.84 ±0.01	263.40 ±0.05

2.3.5 *超声功率* 固定反溶剂/溶剂体积比 12∶1、分离乳清蛋白/厚朴酚投料比 10∶1、磁搅转速 400 r/min、探针超声时间 2 min。考察超声功率 45、90、180 W 对 MAG – WPI – NPs 包封

率和粒径的影响,结果见表 5。超声功率在 10 W 时得到最优包封率和粒径,故选择超声功率为 10 W。

表 5 超声功率考察 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

超声功率/(W)	包封率/(%)	粒径/(nm)
0	90.28 ±0.04	281.27 ±0.03
10	95.19 ±0.01	240.20 ±0.02
30	91.58 ±0.07	247.00 ±0.03
50	90.89 ±0.08	270.73 ±0.02

2.4 Box – Behnken 设计优化 MAG – WPI – NPs 制备工艺

2.4.1 Box – Behnken 设计试验 基于单因素试验结果,选择对 MAG – WPI – NPs 制备过程中影响较大的 3 个参数作为考察因素,分别为反溶剂/溶剂体积比(X_1)、分离乳清蛋白/厚朴酚投料比(X_2)和探超时间(X_3),因单因素试验发现各因素对粒径影响较小,且粒径均符合标准,故以包封率(Y)作为评价指标,每个因素设置 3 水平,以代码值表示:-1(低水平)、0(中水平)、+1(高水平)。因素与水平及试验安排与结果见表 6。

表 6 响应面试验因素水平

水平	因素		
	X_1/(%)	X_2	X_3/(%)
-1	8	10	0
0	12	12	1
1	16	14	3

2.4.2 回归模型建立及方差分析 经 Design Expert 10 拟合后设计结果见表 7,符合 2 次多项回归方程:$Y = 97.86 - 0.286\,2A - 0.528\,7B + 1.85C - 0.280\,0AB + 3.95AC + 0.107\,5BC - 8.14A^2 + 1.99B^2 - 6.09C^2$,其显著性检验结果见表 8,结果显示该模型 $F = 70.4$,$P < 0.000\,1$(极显著),表明此方程的回归模型拟合良好,具有统计学意义;且模型的变异系数为 1.02,失拟项 $P = 0.051\,2 > 0.05$(不显著),表明该模型具有较好实验稳定性;决定系数和校正决定系数分别为 0.9891、0.9750,表明模型具有良好的拟合程度;以上数据表明,该模型可用于预测和分析 MAG – WPI – NPs 的最佳制备工艺。

表 7 Box – Behnken 设计及结果

实验号	X_1/(%)	X_2 值	X_3/(%)	包封率/(%)
1	8	12	1.5	92.26
2	16	12	1.5	91.51
3	8	16	1.5	92.47
4	16	16	1.5	90.60
5	8	14	0	85.03
6	16	14	0	77.29
7	8	14	3.0	82.06
8	16	14	3.0	90.13
9	12	12	0	93.51
10	12	16	0	91.53
11	12	12	3.0	95.77
12	12	16	3.0	94.22
13	12	14	1.5	98.56
14	12	14	1.5	97.58
15	12	14	1.5	98.25
16	12	14	1.5	97.37
17	12	14	1.5	97.56

2.4.3 响应面优化与预测 根据拟合结果,绘制三维效应曲线图,各因素交互作用的三维效应面图和二维等高线图如插页XXV图 2 所示,其中固定 1 个因素,绘制另外 2 个因素的交互作用对包封率的影响情况。响应面图能直观反映交互作用对响应值的影响程度,由图中可知,反溶剂/溶剂体积比与探超时间的响应面陡峭,表明二者对 MAG – WPI – NPs 包封率的影响明显($P < 0.05$)。

表 8 响应面二次回归模型的方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
Model	558.04	9	62.00	70.4	<0.000 1	**
A – 溶剂比	0.655 5	1	0.655 5	0.744 3	0.416 9	
B – 投药比	2.24	1	2.24	2.54	0.155 1	
C – 探超时间	27.45	1	27.45	31.17	0.000 8	**
AB	0.313 6	1	0.313 6	0.356 1	0.569 5	
AC	62.49	1	62.49	70.95	<0.000 1	**
BC	0.046 2	1	0.046 2	0.052 5	0.825 3	
A2	279.12	1	279.12	316.92	<0.000 1	**
B2	16.64	1	16.64	18.89	0.003 4	**
C2	156.39	1	156.39	177.57	<0.000 1	**
残差	6.17	7	0.880 7			
失拟项	5.11	3	1.70	6.49	0.051 2	
净误差	1.05	4	0.262 6			
总和	564.21	16				

注:**$P < 0.01$,差异有统计学意义;相关系数 R^2 为 0.989 1,调整复相关系数 R^2_{adj} 为 0.975 0,变异系数为 1.02%。

2.4.4 处方验证 根据软件预测得到最佳制备工艺为反溶剂/溶剂体积比为 12∶1、分离乳清蛋白/厚朴酚投料比为 12∶1、探超时间为 1.5 min,平行制备 3 批 MAG – WPI – NPs,测定最佳制备工艺条件下的 3 个批次的包封率、粒径和 PDI,与预测值相比较,计算实际值与预测值之间的偏差,结果见表 9。3 个批次的平均相对偏差为 0.99%,可知实测值与预测值的结果相近且验证实验的重复性较好,证明使用 Box – Behnken 设计 – 效应面法优化 MAG – WPI – NPs 制备工艺结果可靠。

偏差 =(实际值 – 预测值)/预测值

表 9 处方的验证试验($n=3$) 单位:%

批次	包封率	实测值	预测值	偏差
1	97.92	98.57 ±0.46	98.99	0.99%
2	98.99			
3	98.80			

2.5 MAG – WPI – NPs 制剂表征

2.5.1 纳米粒形态观察 由插页XXV图 3 可知,优化后的纳米粒外观澄清透明,微泛蓝光。使用 TEM 观察纳米粒的微观形貌,用滴管吸取少量 MAG – WPI – NPs 并滴加于专用铜网上,使用 2.0% 磷钨酸钠负染色,自然挥干后观察,TEM 图显示纳米粒呈规则圆球状。

2.5.2 粒径、ζ 电位的测定 按最优处方制备的 MAG – WPI – NPs,对其进行粒径和电位测定,结果见插页XXVI图 4、插页XXVI图 5。平行 3 组实验后 MAG – WPI – NPs 的平均粒径为(227.33 ±0.02)nm;多分散指数 PDI 为(0.136 9 ±0.26)%;ζ 电位值为(-23.60 ±0.02)mV。结果表明,优化后的纳米粒直径在 200 nm 左右,且分布均一,体系带负电荷,呈现良好的稳定性。

2.5.3 纳米粒红外光谱分析 采用傅里叶变换红外吸收光谱仪(fourier transform infrared spectrometer,FTIR)进行红外光谱表征[14],研究其红外吸收特性,扫描范围为 500 ~ 4500 cm^{-1}。

记录数据，通过解析 MAG、WPI、MAG－WPI－NPs 以及 MAG－WPI 复合物红外光谱的差异，判断厚朴酚是否成功负载在 WPI 上。结果如插页ⅩⅩⅦ图 6，MAG－WPI－NPs 与 WPI 存在相似的 FTIR 光谱，表明 WPI 和 MAG 之间没有形成新的共价键。MAG 结构中存在酚羟基，在 FT－IR 图中 3 153.54 cm^{-1} 和 1 230.16 cm^{-1} 分别是－OH 和 C－O 的伸缩振动峰，1 636.54 cm^{-1} 是苯环骨架 C＝C 的伸缩振动峰；WPI 主要成分有 α－乳清白蛋白和 β－乳球蛋白，FT－IR 图中在 3 003.11 cm^{-1} 处观察到，由于脂族基团的 C－H 拉伸引起的几个特征峰，证实了其存在；由于 O－H 键的伸缩，在 3200～3600 cm^{-1} 范围内的 WPI 光谱中出现了一个强峰，当 MAG 被包封到 WPI 后，3 288.66 cm^{-1} 处的这种 O－H 拉伸振动略微移动到 3 291.21 cm^{-1}，这表明 WPI 和 MAG 之间形成了氢键；图中 C－O 基团的拉伸振动在 1600～1700 cm^{-1} 区域出现酰胺Ⅰ吸收带轨，并且在添加 MAG 后，该吸收带没有显著移动，同时随着 MAG 的加入，1500～1600 cm^{-1} 区域的酰胺Ⅱ吸收带从 1 541.56 移动到 1 539.66 cm^{-1}，表明 WPI 和 MAG 的 C－N 和 N－H 基团之间存在相互作用，此外，还发现添加 MAG 后酰胺Ⅰ和Ⅱ带的相对强度发生了变化，这表明 WPI 和 MAG 的结合之间可能存在静电排斥或疏水相互作用，证明通过自组装形成了纳米粒。综上，可以得出结论，纳米粒的成功制备是通过 MAG 和 WPI 分子间的非共价作用力自组装形成。

2.5.4 *储存稳定性* 将 MAG－WPI－NPs 分别置于室温 25 ℃（35 d）和冰箱 4 ℃（35 d）条件下，记录粒径和 PDI 值随储存时间的变化情况，结果见表 10。可知纳米粒在室温 6 d 内粒径、PDI 几乎无变化，从第 7 天开始粒径和 PDI 的增长变化速率明显加快但肉眼未见纳米粒团聚现象，到第 7 天开始出现不溶性微粒。纳米粒在 4 ℃冰箱内放置 35 d 内粒径和 PDI 较稳定。

表 10 MAG－WPI－NPs 在室温（25 ℃）和 4 ℃条件下的储存稳定性（$n=3, \bar{x} \pm s$）

t/(d)	室温/25 ℃ 平均粒径	室温/25 ℃ PDI	t/(d)	4 ℃ 平均粒径	4 ℃ PDI
0	221.77±0.37	10.13±0.32	0	226.67±0.01	16.83±0.22
3	233.57±0.02	4.47±1.15	7	254.70±0.04	19.43±0.09
6	258.93±0.02	12.43±0.13	15	259.70±0.01	15.87±0.21
7	310.33±0.04	21.70±0.18	25	257.03±0.05	17.77±0.31
35	367.33±0.08	25.10±0.06	35	261.83±0.05	21.60±0.14

2.6 *1，1－二苯基－2－三硝基苯肼（1，1－Diphenyl－2－picrylhydrazyl，DPPH）法测定 MAG－WPI－NPs 抗氧化活性*

参考谢小丽等[15]方法并根据实验稍作修改，称取 39.4 mg DPPH 加入 10 mL 无水乙醇中，超声 2 min 使其完全溶解，制备成 10 mmol/L 的 DPPH 母液并避光密封保存于 4 ℃冰箱。用无水乙醇将 DPPH 母液稀释成 0.1 mmol/L，分别吸取 2 mL 0.5、1、2、4、8、16、32 mg/mL 质量浓度的各样品溶液加入到 2 mL DPPH 溶液（0.1 mmol/L）中，充分混匀，室温避光静置 30 min，采用紫外可见分光光度计在 517 nm 处测定吸光值（A_1）。以 2 mL 无水乙醇替代样品溶液测定吸光度 A_0，再以 2 mL 无水乙醇替代 DPPH 溶液并测定吸光度 A_2，以 Vc 作为阳性对照，每个质量浓度的各样品和对照均重复 3 次，取平均值。

DPPH 自由基清除率按以下公式计算。

DPPH 自由基清除率＝$[1-(A_1-A_2)/A_0]\times 100\%$

结果见图 7，MAG－WPI－NPs 有一定清除 DPPH 自由基的能力，在 0～1 mg/mL 质量浓度范围内，MAG－WPI－NPs 对 DPPH 自由基清除能力均随着质量浓度的增加而提高，清除率可达到 82.58%，远高于游离药物，但低于 VC。

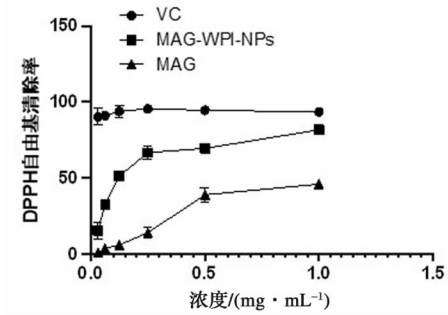


图 7 DPPH 自由基清除能力

2.7 *MAG－WPI－NPs 抗大肠杆菌作用研究*

2.7.1 *牛津杯扩散法测 MAG－WPI－NPs 抑菌活性* 活化大肠杆菌并制成菌悬液，利用细胞计数板计算菌悬液浓度，并校正至 10^6 CFU/mL 备用。在无菌条件下，用已灭菌的培养基制成平板，待冷却凝固后，分别加入 200 μL 菌悬液，用无菌涂布器涂布均匀，冷却干燥待用。设 MAG－WPI－NPs 组（1 mg/mL）、MAG 组（1 mg/mL），以去离子水为空白对照组。在制备好的平板中均匀放置 3 只无菌牛津杯，每只加入对应组溶液 100 μL，每组平行 3 次，置于恒温培养箱中 37 ℃条件下培养 24 h，测量记录抑菌圈直径大小。结果如插页ⅩⅩⅦ图 8 所示，MAG－WPI－NPs（1 mg/mL）抑菌圈直径为（1.95±0.01）cm，MAG（1 mg/mL）抑菌圈直径为（1.41±0.01）cm，空白对照组抑菌圈直径为（0.5±0.01）cm，表明 MAG－WPI－NPs 较游离 MAG 有明显抑菌效果。

2.7.2 *MAG－WPI－NPs 抗菌 MIC 值测定* 参考周蕙祯等[16]并根据实验稍作修改，用试管 2 倍稀释法，测定 MAG－WPI－NPs 对临床分离大肠杆菌的最小抑菌浓度（MIC）[17]。采用牛津杯抑菌法，方法同 2.7.1，制备 MAG－WPI－NPs（1 mg/mL），2 倍稀释，将载有不同浓度的 MAG－WPI－NPs 溶液 100 μL，分别加入牛津杯中，置于恒温培养箱中 37℃条件下培养 24 h，测定抑菌圈直径。结果表示，抑菌圈直径与 MAG－WPI－NPs 的质量浓度呈正相关，测得结果 MIC 浓度为 0.25 mg/mL。

3 讨论

厚朴的主要活性成分之一厚朴酚，是一种具有广泛药理活性的多酚类化合物，研究表明厚朴酚可以抗菌[18]、抗癌[19]、抗炎[20]、抗氧化[21]等，对神经[22]、心血管[23]和呼吸系统等[24]均有明显的药理作用，极具开发价值，但厚朴酚水溶性差、生物利用度低等缺点严重限制了其临床应用[25]。在本研究中，创新性设计了一种新型自组装纳米粒，以期促进厚朴酚开发应用。SAN 区别于普通纳米粒的突出优点是对疏水性药物包封率高、药物泄漏少，能使难溶性药物的溶解度增加，且提高药物的包封率和载药量[26]。SAN 是在选择性溶剂中通过非共价键作用，如氢键、范德华力以及弱离子键作用，自发缔结成热力学稳定的纳米微粒。在体内环境中，SAN 拥有比其他微粒分散体系更稳定，粒径更小、体内滞留时间更长等特点[27]。在初步实验中，选择了天然食品级自组装材料分离乳清蛋白（WPI）作为载体，WPI 是从蛋白质含量高于 90% 的奶酪中获得的一种重要副产品，其拥有良好的乳化性和优越的结构性能，已被广泛用作包封的载体材料[28]。

在本研究中，采用去溶剂化法制备 MAG－WPI－NPs，利用单因素考察结合 Box－Behnken 设计－效应面法成功优化了其制备工艺参数，以期将 MAG 更好包裹在 WPI 中来提高其水溶性和生物利用度。在体外药效研究发现，MAG 与 WPI 形成的自组装纳米粒在抗氧化、抗大肠杆菌方面都具有明显的抑制作用，且与游离 MAG 相比具有显著性差异，这可能与本研究选用的 WPI 载体有关，研究表明，多酚可以通过共价键和非共价键与蛋白质相互作用，促进蛋白质之间的交联，从而改善其抗菌、抗氧化等性能[29]。WPI 还因其具有抗菌、抗炎和免疫调节等广泛的药理活性[30] 可与厚朴酚起到协同增效作用。NEAGU C 等[31] 利用 WPI 为载体制备了蛋白－多酚复合物，发现多酚与 WPI 的主要结合力为疏水作用，且在自组装过程中采用探针超声可以促进多酚进入 WPI 内部，使之结合更加紧密，并表现出更好的抗氧化性和防降解能力。本实验响应面结果中亦发现探超时间与溶剂比的交互因素突出；在 TEM 下观察到 MAG－WPI－NPs 呈球形或类球形分布，证实了 MAG 与 WPI 自组装成功，此外图中观察到其外侧可能为双层结构，MAG 可能经过层层扩散渗透，具有缓释效果和一定的防降解能力；同时 FT－IR 数据证实了 MAG 和 WPI 的疏水作用，WPI 内核通过疏水性相互作用在特定条件下形成具有 cross－β－折叠结构的有序聚合物，以达增溶、提高生物利用度的目的，且 MAG 作为疏水化合物，通过强疏水相互作用与 WPI 契合，从而使纳米颗粒结构更加紧凑。

综上，本实验创新性将厚朴酚与分离乳清蛋白自组装，通过单因素实验结合 Box－Behnken 设计－效应面法筛选制备了一种绿色安全、无毒无害的 MAG－WPI－NPs，制备简单、工艺成熟，不仅解决厚朴酚溶解性差、生物利用度低的制剂难题，同时与分离乳清蛋白载体相辅相成、协同增效，充分发挥厚朴酚的治疗活性作用，在广泛应用治疗多种疾病上有巨大的应用前景，为厚朴酚综合利用和临床应用开发奠定基础。

参考文献

[1] 张倩，刘芳，张芮苑，等. 厚朴挥发油纳米乳凝胶的制备及其对溃疡性结肠炎小鼠的药效评价[J]. 中草药，2024，55(3)：746－756.
[2] MING－XIN GUO M M，WU X，FENG Y F，et al. Research progress on the structural modification of magnolol and honokiol and the biological activities of their derivatives[J]. Chem Biodivers，2023，20(8)：e202300754.
[3] 戴运好. 厚朴酚磷脂复合物固化技术的初步研究[D]. 南京：南京中医药大学，2018.
[4] 李杰，杨军辉，蒋志涛，等. 厚朴酚固体分散体的制备及生物利用度研究[J]. 中草药，2019，50(14)：3337－3344.
[5] 刘会珍，董丹丹，范明松. 不同厚朴酚制剂的制备、表征及其在 SD 大鼠体内药动学行为比较[J]. 中草药，2020，51(17)：4442－4448.
[6] 沈贝莉莎，安莲英，邱能，等. 厚朴酚脂质体的制备与表征[J]. 时珍国医国药，2016，27(7)：1647－1650.
[7] 柳琳，蔡鑫君，柴国宝，等. 自组装纳米粒及其作为药物载体的研究进展[J]. 中草药，2009，40(3)：479－483.
[8] 胡静雯，贾国香，董亚倩，等. 从中药全过程视角探析纳米颗粒自组装行为及应用[J]. 中草药，2022，53(22)：7307－7316.
[9] 李岭慧，廖婉，张倩，等. 基于 Box－Behnken 设计－效应面法优化姜黄素－乳铁蛋白纳米粒制备工艺和体外评价研究[J]. 中草药，2022，53(19)：5980－5990.
[10] LI Y，LIU J，ZHANG H，et al. A Comprehensive review of self－assembled food protein－derived multicomponent peptides：from forming mechanism and structural diversity to applications[J]. J Agric Food Chem，2023，71(30)：11304－11319.
[11] MA S，SHI C，WANG C，et al. Effects of ultrasound treatment on physiochemical properties and antimicrobial activities of whey protein－totarol nanoparticles[J]. J Food Prot，2017，80(10)：1657－1665.
[12] SHEN X，ZHAO C，LU J，et al. Physicochemical properties of whey－protein－stabilized astaxanthin nanodispersion and its transport via a Caco－2 monolayer[J]. J Agric Food Chem，2018，66(6)：1472－1478.
[13] ZHOU S，HAN L，LU K，et al. Whey protein isolate－phytosterols nanoparticles：Preparation，characterization，and stabilized food－grade pickering emulsions[J]. Food Chem，2022，384：132486.
[14] 曹佳，王令令，王飞，等. 厚朴酚固体分散体的制备及其在肉鸡的药代动力学[J]. 中国兽医学报，2023，43(6)：1297－1303.
[15] 谢小丽，胡璇，陈振夏，等. 高良姜精油提取工艺优化、成分分析及其生物活性研究[J]. 中草药，2023，54(18)：5904－5915.
[16] 周蕙祯，罗伟，陈爽等. 瑞香狼毒花中香豆素成分及生物活性研究[J]. 中草药，2021，52(4)：943－950.
[17] 刘钱，张文文，姚运秀，等. 基于药效作用值的双黄连系列制剂再评价研究[J]. 中草药，2019，50(4)：903－909.
[18] JIANG J，HOU X，XU K，et al. Bacteria－targeted magnolol－loaded multifunctional nanocomplexes for antibacterial and anti－inflammatory treatment[J]. Biomed Mater，2024，19(2)：123－125.
[19] WANG Y，SUN C，HUANG L，et al. Magnolol－loaded cholesteryl biguanide conjugate hydrochloride nanoparticles for triple－negative breast cancer therapy[J]. Int J Pharm，2022，615：121509.
[20] WEI W，DEJIE L，XIAOJING S，et al. Magnolol inhibits the inflammatory response in mouse mammary epithelial cells and a mouse mastitis model[J]. Inflammation，2015，38(1)：16－26.
[21] 贾音，任晨曦，夏悠楠，等. 厚朴酚的药理作用研究现状[J]. 生物化工，2023，9(3)：170－174.
[22] KUNDU M，DAS S，NANDI S，et al. Magnolol and Temozolomide exhibit a synergistic anti－glioma activity through MGMT inhibition[J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis，2023，1869(7)：166782.
[23] YANG J，WEI Y，ZHAO T，et al. Magnolol effectively ameliorates diabetic peripheral neuropathy in mice[J]. Phytomedicine，2022，107：154434.
[24] TANG Y，WANG L，YI T，et al. Synergistic effects of autophagy/mitophagy inhibitors and magnolol promote apoptosis and antitumor efficacy[J]. Acta Pharm Sin B，2021，11(12)：3966－3982.
[25] 唐岚，裘帅波，吴兰，等. 厚朴酚－交联羧甲基纤维素钠固体分散体的制备及体外溶出研究[J]. 中国中药杂志，2016，41(3)：433－437.
[26] 黄菊，朱禹，肖航，等. 中药自组装纳米策略在肿瘤治疗中应用的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志，2023，29(24)：185－193.
[27] 陈红谨，李培硕，张志俊，等. 消渴降糖速溶茶的制备工艺研究[J]. 实用中医内科杂志，2022，36(5)：49－51.
[28] LIU K，KONG X L，LI Q M，et al. Stability and bioavailability of vitamin D3 encapsulated in composite gels of whey protein isolate and lotus root amylopectin[J]. Carbohydr Polym，2020，227：115337.
[29] 徐伟，俞蓉欣，张相春，等. 多酚自组装抗菌生物材料的构建及其应用进展[J]. 茶叶科学，2024，44(1)：1－15.
[30] 梁婉诗，刘欣桐，吴苇桐，等. 乳清蛋白制备可食用膜的研究进展[J]. 中国乳品工业，2023，51(6)：40－44.
[31] NEAGU C，MIHALCEA L，ENACHI E，et al. Cross－linked microencapsulation of CO_2 supercritical extracted oleoresins from sea buckthorn：evidence of targeted functionality and stability[J]. Molecules，2020，25(10)：2422.

Box – Behnken 响应面优化厚朴酚 – 分离乳清蛋白自组装纳米粒制备工艺及体外评价

(正文见 77 – 82 页)

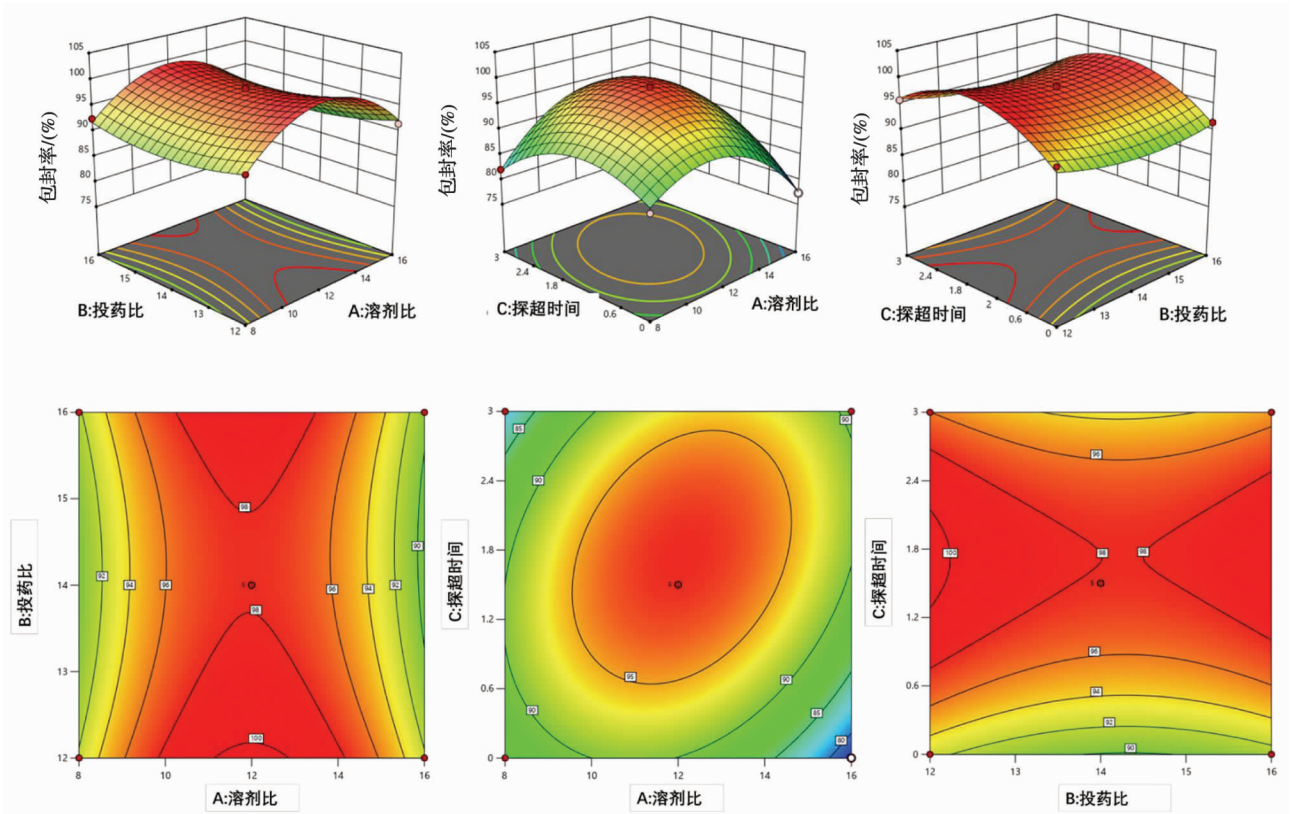


图 2 各因素对综合评分的效应面和等高线图

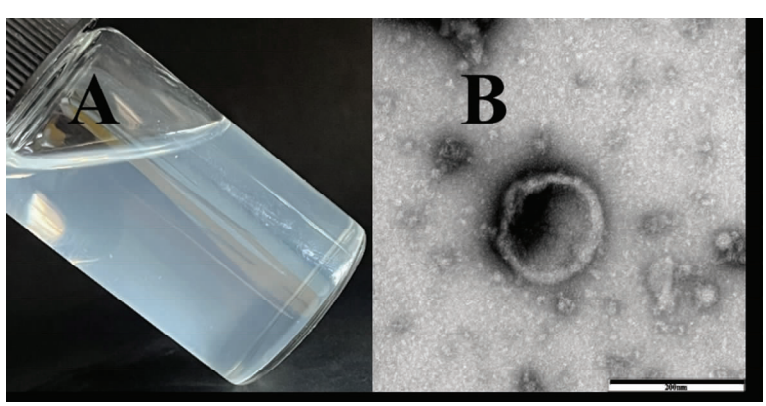


图 3 MAG – WPI – NPs 的外观(A)和 TEM 图(B ×20 000)

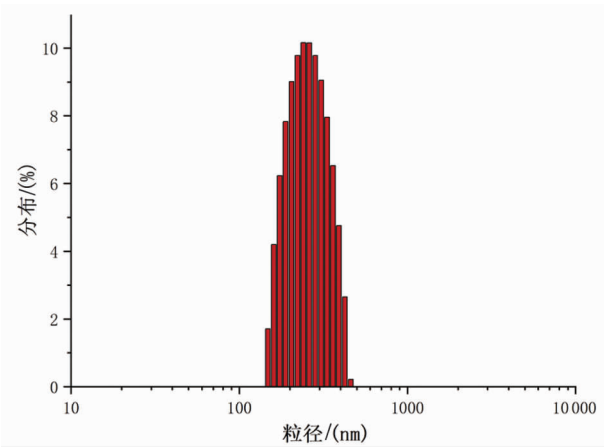


图 4 MAG – WPI – NPs 粒径图

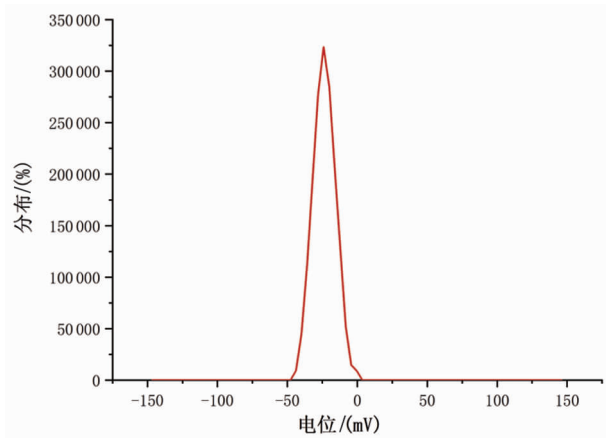


图 5 MAG – WPI – NPs ζ 电位图

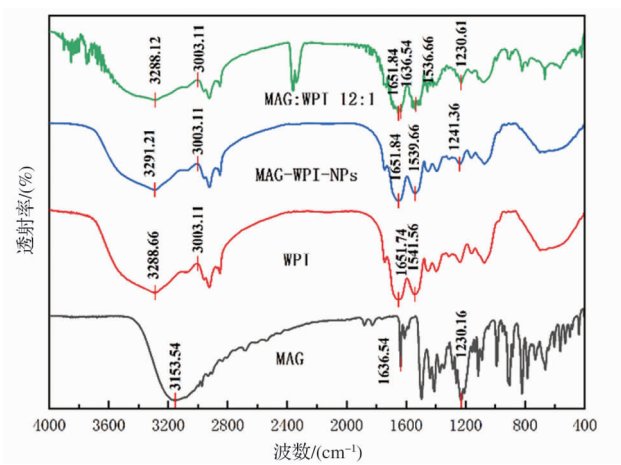
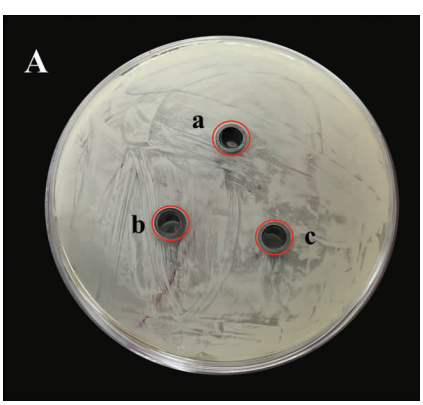
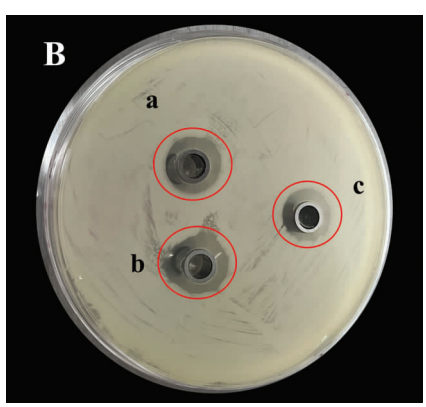


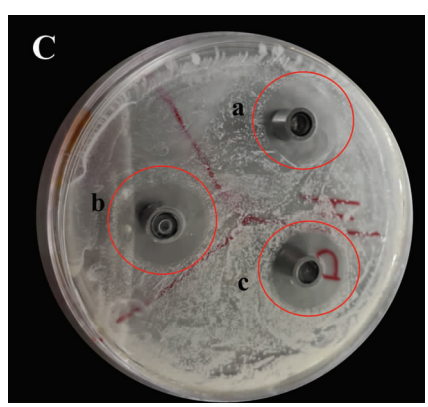
图 6 MAG – WPI – NPs 的 FT – IR 图



A. 空白对照组



B. MAG(1 mg/mL)组



C. MAG – WPI – NPs(1 mg/mL)组

图 8 牛津杯抑菌法抗菌能力