

柠檬苦素白蛋白纳米粒制备工艺优化及其分子表征

Optimization of preparation process and molecular characterization of limonin-albumin nanoparticles using response surface methodology

梁鑫富^{1,2,3}曾泽政^{1,2}陈德强^{1,2}LIANG Xinfu^{1,2,3} ZENG Zezheng^{1,2} CHEN Deqiang^{1,2}黄 丽^{1,2}董庆亮^{1,2}HUANG Li^{1,2} DONG Qingliang^{1,2}

(1. 北部湾大学食品工程学院, 广西 钦州 535000; 2. 广西高校北部湾海产品高值化利用与
预制食品重点实验室, 广西 钦州 535000; 3. 广西大学轻工与食品工程学院, 广西 南宁 530000)

(1. Food Engineering College, Beibu Gulf University, Qinzhou, Guangxi 535000, China; 2. Guangxi
College and University Key Laboratory of High-value Utilization of Seafood and Prepared Food in
Beibu Gulf, Qinzhou, Guangxi 535000, China; 3. College of Light Industry and Food Engineering,
Guangxi University, Nanning, Guangxi 530000, China)

摘要: [目的] 构建柠檬苦素白蛋白纳米粒, 为进一步应用柠檬苦素提供理论依据。[方法] 以牛血清白蛋白为纳米载体, 通过去溶剂化—化学交联法制备柠檬苦素白蛋白纳米粒, 以包埋率为指标, 通过单因素试验和响应面试验确定最佳制备工艺, 并对纳米粒进行表征。[结果] 当牛血清白蛋白添加量为 64 mg, 柠檬苦素添加量为 4 mg, 醇水体积比为 5 : 1, 交联剂添加量为 125 μ L 时, 交联固化后得到的柠檬苦素白蛋白纳米粒平均粒径为 (152.2 ± 0.5) nm, 多分散指数为 0.196 ± 0.026 , 包埋率为 $(79.21 \pm 0.36)\%$; 通过低压透射电子显微镜观察到的柠檬苦素白蛋白纳米粒呈现圆球形, 而傅里叶红外光谱及 X 射线衍射结果表明柠檬苦素以无定型或者无序状态被成功包裹在白蛋白中; 该柠檬苦素白蛋白纳米粒悬浮液具有良好的贮藏稳定性。[结论] 采用去溶剂化—化学交联法制备的柠檬苦素白蛋白纳米粒贮藏稳定性良好。

关键词: 柠檬苦素; 牛血清白蛋白; 纳米粒; 稳定性

Abstract: [Objective] The construction of limonin-albumin

nanoparticles provides a theoretical basis for the further application of limonin. [Methods] Limonin-albumin nanoparticles were prepared by desolvation-chemical crosslinking method using bovine serum albumin as nanocarriers. The optimal preparation process was determined by single factor experiment and response surface test with embedding rate as index, and the nanoparticles were characterized. [Results] When the amount of bovine serum albumin was 64 mg, the amount of lemon bitter was 4 mg, the specific volume ratio of alcohol to water was 5 : 1, and the amount of crosslinker was 125 μ L, the average particle size and polydispersion index of limonin nanoparticles were (152.2 ± 0.5) nm and 0.196 ± 0.026 respectively. The embedding efficiency was $(79.21 \pm 0.36)\%$. The limonin-albumin nanoparticles observed under low-pressure transmission electron microscopy showed a spherical shape. Infrared spectroscopy and X-ray diffraction results showed that limonin was successfully encapsulated in albumin in an amorphous or disordered state. The limonin-albumin nanoparticle suspension has good storage stability. [Conclusion] The limonin-albumin nanoparticles prepared by desolvation-chemical crosslinking method had good storage stability.

Keywords: limonin; bovine serum albumin; nanoparticles; stability

基金项目: 广西科技计划项目 (编号: 桂科 AD20159019); 北部湾大学高层次人才科研启动经费项目 (编号: 2019KYQD10)

作者简介: 梁鑫富, 男, 广西大学在读硕士研究生。

通信作者: 董庆亮 (1980—), 男, 北部湾大学副教授, 博士。

E-mail: dql80@163.com

收稿日期: 2024-02-01 **改回日期:** 2024-06-05

柠檬苦素也被称为黄柏内酯或吴茱萸内酯, 是主要

存在于芸香科及楝科等植物中的四环三萜化合物,同时也是植物体中重要的次生代谢物之一,其具有多种生理活性,如抗氧化、抗肿瘤、抗肥胖、抗虫害及镇痛消炎等^[1]。但柠檬苦素水溶性较差,在水中平衡溶解度仅为6.85 mg/L(37 ℃)^[2],并且柠檬苦素结构稳定性易受环境因素(温度、pH、与光照和氧气接触的时长等)影响而发生不同程度的降解^[3],大大限制了柠檬苦素的进一步应用和开发。将柠檬苦素进行包埋,可以有效改善柠檬苦素结构稳定性差和生物利用率低的问题。张亚杰等^[4]以海藻酸钠—壳聚糖—氯化钙体系为壁材,采用锐孔造粒法制备柚皮苷/柠檬苦素微胶囊,发现微胶囊化可以提高柠檬苦素的热稳定性,促进柠檬苦素在肠道内的生物转化与吸收,提高其利用率,但该法制备工艺相对复杂,不利于工业生产。

随着紫杉醇白蛋白纳米粒的成功上市并应用于临床治疗,包埋天然活性成分的白蛋白纳米粒研究及开发逐渐成为了研究热门,白蛋白纳米载体已经解决了多种天然活性成分存在的溶解性差、稳定性差及其生物利用率低等问题^[4-6]。牛血清白蛋白是一种生物大分子,具有良好的生物相容性、无毒、无免疫原性及获取成本低等特点^[7-8],并且牛血清白蛋白分子结构中的氨基酸相互扭曲成团状或蜂窝状,结构中形成了大量的空隙,空间结构有利于携带天然活性成分,是制备天然活性成分纳米运输载体的常见材料之一^[9-10]。目前关于构建白蛋白纳米颗粒的方法有很多,其中去溶剂化—交联固化法是最常用的方法之一,具有操作简单、可重复性好和纳米粒粒径均匀等优点,该方法先利用脱水剂(乙醇和甲醇等)去除白蛋白表面水化膜,导致白蛋白发生相分离和聚集,然后再加入交联剂进行交联固化,即可得到稳定的白蛋白纳米颗粒,而影响白蛋白纳米颗粒性能的主要因素包括白蛋白添加量、天然活性成分添加量、醇水体积比例及交联剂添加量等^[11]。

有研究^[12-13]发现,柠檬苦素能通过氢键作用和范德华力等作用力与牛血清白蛋白自发结合形成稳定复合物,满足了构建基于白蛋白的纳米载体系统原则。研究拟采用去溶剂化—交联固化法制备柠檬苦素白蛋白纳米粒,通过响应面法优化制备工艺,并对该纳米粒进行分子表征,以期为进一步开发和应用柠檬苦素提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

牛血清白蛋白:纯度 $\geq 98\%$,低脂肪酸,上海麦克林生化科技股份有限公司;

柠檬苦素:纯度 $\geq 98\%$,上海源叶生物科技有限公司;

无水乙醇、50%戊二醛等:分析纯,上海麦克林生化

科技股份有限公司。

1.1.2 主要仪器设备

集热式恒温加热磁力搅拌器:DF-101S型,郑州长城科工贸有限公司;

水浴恒温摇床:ZWY-110X50型,上海智城分析仪器制造有限公司;

高速冷冻离心机:TGL-16M型,常州金坛良友仪器有限公司;

紫外—可见分光光度计:Evolution 201型,美国 Thermo 公司;

傅里叶红外光谱仪:Nicolet 5700型,美国 Thermo 公司;

马尔文粒度分析仪:Nano ZS90型,英国 Malvern 公司;

X射线衍射仪:D/MAX2500V型,日本 Rigaku Corporation 公司;

低电压透射电子显微镜:HT7820型,日本 Hitachi 公司。

1.2 方法

1.2.1 柠檬苦素标准曲线建立 参考文献[3]的方法并稍加改进,建立柠檬苦素标准曲线,用无水乙醇配制0.20 mg/mL柠檬苦素标准品溶液;准确吸取0.2,0.4,0.6,0.8,1.0 mL柠檬苦素标准液于10 mL棕色玻璃瓶中,用无水乙醇定容至2.0 mL,然后分别加入5.0 mL显色剂,混合均匀,反应30 min后测定490 nm处的吸光度值,每个样品重复3次并绘制柠檬苦素标准曲线,得到柠檬苦素的回归方程 $Y=7.9767X+0.0056$, $R^2=0.9986$ 。

1.2.2 柠檬苦素白蛋白纳米粒制备 参考文献[14]的方法并稍加改进,称取一定量牛血清白蛋白溶于5 mL去离子水中,制得水相;称取一定质量的柠檬苦素溶于无水乙醇中,制得有机相;水相以400 r/min持续搅拌,用微量注射器将有机相缓慢滴加到水相中;有机相滴加结束后迅速加入适量的0.25%戊二醛交联剂;再将混合液全部转移至离心管中,置于水浴恒温摇床中继续避光固化24 h;交联固化结束后对其进行冷冻离心,离心参数为温度4 ℃,转速11 000 r/min,离心时间45 min;离心上清液部分用于后续测定包埋率,而沉淀部分用去离子水反复洗涤两次,洗去残留的戊二醛及乙醇等,洗涤结束后再加去离子水复溶即得到柠檬苦素白蛋白纳米粒悬浮液。

1.2.3 柠檬苦素白蛋白纳米粒包埋率计算 取1.2.2的上清液按照1.2.1方法测定游离柠檬苦素含量,以空白白蛋白纳米粒组为对照,按式(1)计算包埋率。

$$E = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

E ——包埋率,%;

m_1 ——加入柠檬苦素总含量,mg/mL;

m_2 ——游离柠檬苦素含量,mg/mL。

1.2.4 单因素试验 以柠檬苦素白蛋白纳米粒制备方法为基础,探究牛血清白蛋白添加量、柠檬苦素添加量、醇水体积比及交联剂添加量对包埋率的影响。基本工艺参数为:60 mg 牛血清白蛋白溶于去离子水中;3 mg 柠檬苦素溶于乙醇中;醇水体积比为 5:1;0.25% 交联剂添加量为 125 μ L。在其他因素不变的情况下,选择牛血清白蛋白添加量为 40,50,60,70,80 mg;柠檬苦素添加量为 1,2,3,4,5 mg;醇水体积比为 3:1,4:1,5:1,6:1,7:1;0.25% 交联剂添加量为 75,100,125,150,175 μ L,考察各因素对柠檬苦素包埋率的影响。

1.2.5 响应面试验 在单因素试验的基础上,选取影响相对较大的因素,以包埋率为响应值,根据 Box-Behnken 中心组合设计原理,设计三因素三水平响应面优化分析试验,以确定最佳包埋工艺。

1.2.6 粒径及粒径分布测定 取白蛋白纳米粒及柠檬苦素白蛋白纳米粒的悬浮液稀释到适当倍数,用 Nano ZS90 型马尔文粒度分析仪测定其粒径、粒径分布及多分散指数(polydispersity index,PDI),每份样品重复测 3 次。

1.2.7 透射电子显微镜观察柠檬苦素白蛋白纳米粒形态

取柠檬苦素白蛋白纳米粒悬浮液稀释到适当倍数,点样至铜网上,再用 2.0% 的磷钨酸染色,吸取多余染液,待自然挥干后,通过低压透射电子显微镜观察颗粒微观特征。

1.2.8 傅里叶变换红外光谱测定 分别测定柠檬苦素、白蛋白纳米粒冻干样、柠檬苦素白蛋白纳米粒冻干样、白蛋白纳米粒冻干样与柠檬苦素物理混合物的傅里叶变换红外光谱,其测定光谱范围为 4 000~500 cm^{-1} 。

1.2.9 X 射线衍射图谱测定 分别测定柠檬苦素、白蛋白纳米粒冻干样、柠檬苦素白蛋白纳米粒冻干样、白蛋白纳米粒冻干样与柠檬苦素物理混合物的 X 射线衍射图谱,测定条件为:衍射角扫描角度 2θ ,扫描速率 5 ($^\circ$)/min,电压 40 kV,电流 30 mA,扫描范围 $10^\circ\sim 80^\circ$ 。

1.2.10 柠檬苦素白蛋白纳米粒贮藏稳定性考察 将柠檬苦素白蛋白悬浮液装于玻璃瓶中,密封后置于 4 $^\circ\text{C}$ 冰箱中保存,分别于第 0、5、10、15、20、25 天取样,使用 Nano ZS90 型马尔文粒度分析仪测定其粒径和 PDI,初步考究其稳定性。

1.2.11 数据处理 使用 Excel 2016、Origin 2021 等软件进行数据处理和作图。

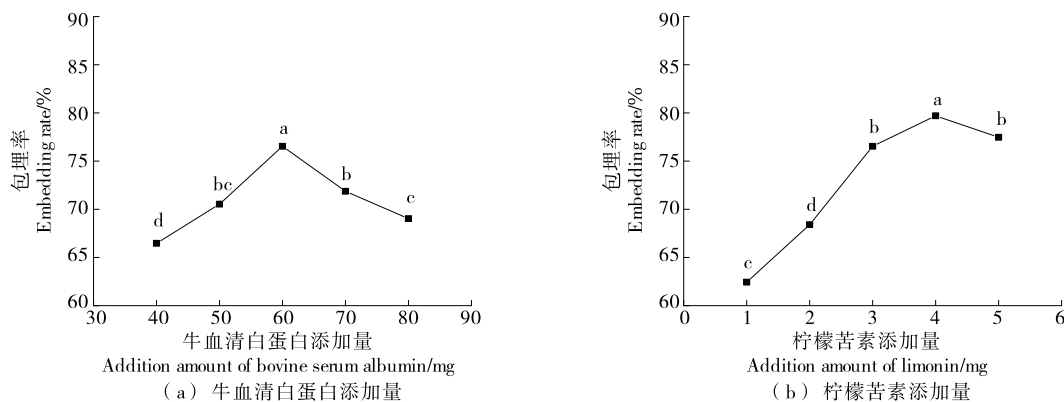
2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 牛血清白蛋白添加量对包埋率的影响 如图 1(a) 所示,随着牛血清白蛋白添加量的增加,包埋率显著上升,当牛血清白蛋白添加量为 60 mg 时,包埋率最大,再继续增加牛血清白蛋白的添加量,包埋率显著下降,可能是由于交联剂添加量固定,牛血清白蛋白添加量超过 60 mg 后,交联剂不能很好地交联成球,导致包埋率下降。这与黄婷等^[4]制备灵芝三萜白蛋白纳米颗粒时牛血清白蛋白添加量对包埋率的影响变化趋势一致。此外,当牛血清白蛋白添加量为 80 mg 时,将有机相滴加至水相过程中出现白蛋白贴壁现象,不利于包埋柠檬苦素,故选择牛血清白蛋白添加量 50,60,70 mg 3 个水平进行响应面试验。

2.1.2 柠檬苦素添加量对包埋率的影响 如图 1(b) 所示,随着柠檬苦素添加量的增加,包埋率显著上升,当柠檬苦素添加量为 4 mg 时,包埋率最大,继续增加柠檬苦素的添加量,包埋率显著下降,可能是由于牛血清白蛋白添加量固定,牛血清白蛋白的包埋能力达到相对饱和所致,并非是柠檬苦素添加量越高而包埋率越高,故选择柠檬苦素添加量 3,4,5 mg 3 个水平进行响应面试验。

2.1.3 醇水体积比对包埋率的影响 如图 2(a) 所示,随着醇水体积比的增加,包埋率显著上升,当醇水体积比为 5:1 时,包埋率最大,继续增加醇水体积比,包埋率显著下降,可能是由于柠檬苦素难溶于水,易溶于乙醇,随着



字母不同表示差异显著($P<0.05$)

图 1 牛血清白蛋白添加量和柠檬苦素添加量对包埋率的影响

Figure 1 The influence of bovine serum albumin mass and limonin mass on the encapsulation efficiency

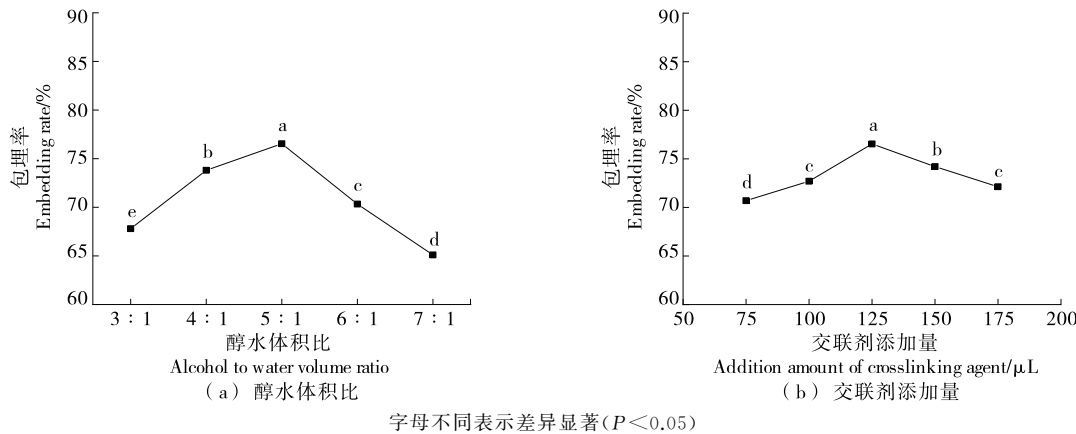


图2 醇水体积比和交联剂添加量对包埋率的影响

Figure 2 The influence of alcohol water ratio and crosslinking agent dosage on encapsulation efficiency

乙醇体积占比的不断增大,柠檬苦素重新溶解于乙醇中,游离的柠檬苦素含量增加,造成包埋率的下降。这与张雪等^[15]制备牧荆素白蛋白纳米时醇水比对包埋率的影响变化趋势一致。此外,添加过量的脱水剂乙醇容易导致白蛋白表面过度脱水化,形成聚集物沉淀,不利于包埋柠檬苦素,故选择醇水体积比4:1,5:1,6:1 3个水平进行响应面实验。

2.1.4 交联剂添加量对包埋率的影响 如图2(b)所示,随着交联剂添加量的增加,包埋率显著上升,交联剂添加量为125 μL 时,包埋率最大,继续增加交联剂的添加量,包埋率显著下降,并且与其他因素相比较,交联剂的添加量对包埋率的影响较小,因此固定交联剂添加量为125 μL 进行响应面实验。

2.2 响应面实验

在单因素实验的基础上,确定交联剂添加量为125 μL ,选取牛血清白蛋白添加量、柠檬苦素添加量及醇水体积比参考因素,设计三因素三水平响应面优化分析实验,响应面因素与水平设计见表1,设计及结果见表2,回归模型的方差分析见表3。

通过软件对表2数据进行多元回归分析,得到包埋率对自变量牛血清白蛋白添加量、柠檬苦素添加量及醇水比的二次多项回归方程:

$$Y = 78.88 + 2.67A - 1.64B + 1.42C - 0.47AB - 0.29AC + 2.20BC - 3.17A^2 - 4.82B^2 - 4.76C^2. \quad (2)$$

表1 响应面实验因素与水平

Table 1 Factors and levels of response surface experiment

编码水平	A 牛血清白蛋白 添加量/mg	B 柠檬苦素 添加量/mg	C 醇水体积比
-1	50	3	4:1
0	60	4	5:1
1	70	5	6:1

由表3可知,回归模型的 P 值为 $0.0008 < 0.05$,说明模型显著;而失拟项 P 值为 $0.1417 > 0.05$,不显著,说明该模型可用来分析该工艺条件;并且 $R^2 = 0.9517$,说明该模型实际值与方程预测值之间有较好的相关性。

通过软件分析,得到的最佳包埋条件为:牛血清白蛋白添加量为64.291 mg,柠檬苦素添加量为3.831 mg,醇水体积比为5.097:1,此最佳包埋条件下的包埋率预测达到79.657%。考虑实际因素,将最优工艺修正为牛血清白蛋白添加量为64 mg,柠檬苦素添加量为4 mg,醇水

表2 响应面实验设计及结果

Table 2 Design and results of response surface experiment

序号	A	B	C	包埋率/%
1	-1	-1	0	68.42
2	0	0	0	78.14
3	0	1	1	69.44
4	1	0	-1	71.53
5	0	0	0	77.78
6	0	1	-1	64.02
7	-1	0	1	70.94
8	0	0	0	78.23
9	0	0	0	80.51
10	1	1	0	72.42
11	1	0	1	75.61
12	1	-1	0	74.78
13	-1	0	-1	65.71
14	0	0	0	79.73
15	-1	1	0	67.94
16	0	-1	1	70.18
17	0	-1	-1	73.57

表 3 回归模型的方差分析[†]

Table 3 Analysis of variance of regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	377.09	9	41.90	15.31	0.000 8
A	56.92	1	56.92	20.80	0.002 6
B	21.55	1	21.55	7.88	0.026 3
C	16.10	1	16.10	5.88	0.045 7
AB	0.88	1	0.88	0.32	0.587 6
AC	0.34	1	0.34	0.12	0.736 2
BC	19.40	1	19.40	7.09	0.032 3
A ²	42.38	1	42.38	15.49	0.005 6
B ²	97.63	1	97.63	35.68	0.000 6
C ²	95.41	1	95.41	34.87	0.000 6
残差	19.15	7	2.74		
失拟项	13.60	3	4.53	3.26	0.141 7
纯误差	5.56	4	1.39		
总和	396.25	16			

[†] $R^2=0.951\ 7$ 。

体积比为 5 : 1,在此修正工艺下进行验证实验,其包埋率为(79.21±0.36)%,与预测值无显著性差异,证明二次项回归模型具有较好的精确度和适用度,能够用于优化柠檬苦素白蛋白纳米颗粒的制备工艺。

2.3 粒径分布

采用 Nano ZS90 型马尔文粒度分析仪对最佳工艺条件制备的白蛋白纳米粒进行测定,其平均粒径为(138.4±0.8) nm,PDI 值为 0.174±0.041;柠檬苦素白蛋白纳米粒的平均粒径为(152.2±0.5) nm,PDI 值为 0.196±0.026,白蛋白纳米粒及柠檬苦素白蛋白纳米粒的粒径分布如图 3 所示,两者粒径分布均呈现单峰,表明粒径分布均匀。

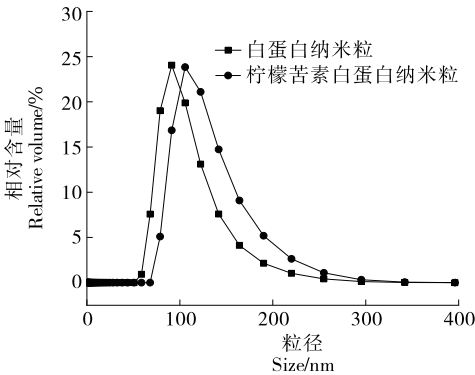


图 3 白蛋白纳米粒及柠檬苦素白蛋白纳米粒的粒径分布

Figure 3 Particle size distribution of bovine serum albumin nanoparticles and limonin- albumin nanoparticles

2.4 低压透射电子显微镜分析

如图 4 所示,单个柠檬苦素白蛋白纳米粒呈规则球形,颗粒饱满,多个柠檬苦素白蛋白纳米粒分布均匀,形态规则,表面基本无粘连,其粒径与用 Nano ZS90 型马尔文粒度分析仪测定的平均粒径相近。

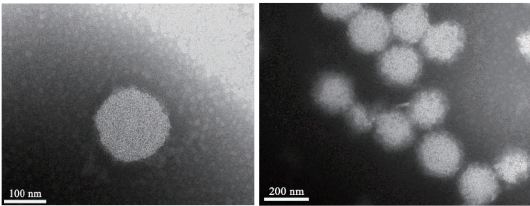
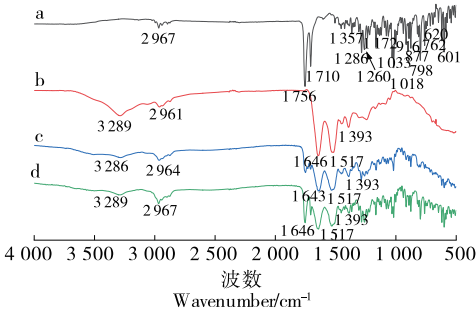


图 4 柠檬苦素白蛋白纳米粒的低压透射电子显微镜图
Figure 4 Low pressure transmission electron microscopy image of limonin-bovine serum albumin nanoparticles

2.5 傅里叶变换红外光谱分析

由图 5 可知,柠檬苦素的红外光谱特征吸收峰包括 2 967,1 756,1 710,1 357,1 286,1 260,1 172,1 033,1 088,916,877 cm^{-1} 等,其中 2 967 cm^{-1} 主要是=C—H 的伸缩振动引起,1 756,1 710 cm^{-1} 主要是由 C=O 的伸缩振动引起,1 286,877,798 cm^{-1} 主要是由 C—O 的伸缩振动引起等^[16]。白蛋白纳米粒的红外光谱特征吸收峰包括 3 289,2 961,1 646,1 517,1 396 cm^{-1} 等,其中 3 289 cm^{-1} 主要是由酰胺 A 带的 N—H 伸缩振动引起,2 961 cm^{-1} 主要是由酰胺 B 带中游离 NH_3^+ 的 N—H 伸缩振动引起,1 646 cm^{-1} 主要是由酰胺 I 带的 C=O 伸缩振动引起,1 517 cm^{-1} 主要是由酰胺 II 带的 C—N 伸缩振动及 N—H 弯曲振动引起,1 396 cm^{-1} 主要是由 CH_2 的弯曲振动引起等^[17-18]。柠檬苦素白蛋白纳米粒的红外光谱图中,出现了部分柠檬苦素的特征峰,如 1 756 cm^{-1} 处的 C=O 的伸缩振动和 877 cm^{-1} 处的 C—O 的伸缩振动,且酰胺 A 处特征峰明显减弱并由 3 289 cm^{-1} 蓝移至 3 286 cm^{-1} ,酰胺 I 带由 1 646 cm^{-1} 蓝



a. 柠檬苦素 b. 白蛋白纳米冻干样 c. 柠檬苦素白蛋白纳米冻干样 d. 白蛋白纳米冻干样与柠檬苦素物理混合

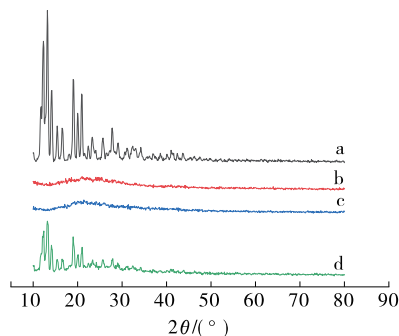
图 5 红外光谱结果

Figure 5 Infrared spectroscopy results

移至 $1\,643\text{ cm}^{-1}$, 而白蛋白纳米与柠檬苦素物理混合的红外光谱图只是两种物质特征峰的简单叠加, 特征峰并未发生任何变化。结果表明, 柠檬苦素已被白蛋白包埋在其中, 即柠檬苦素白蛋白纳米粒制备成功。

2.6 X射线衍射分析

由图6可知, 柠檬苦素出现很多晶型峰, 是一种晶型物质, 与张伟利等^[19]的测试结果一致, 其中强度较大的晶型衍射峰分布在 $10^\circ\sim 22^\circ$ 范围内, 如 11.2° , 11.9° 等处较为明显^[20]。白蛋白纳米粒与柠檬苦素物理混合还保留了柠檬苦素的特征晶体峰, 其特征晶体峰强度有所减弱, 可能是柠檬苦素在混合物中占比较少, 衍射峰被覆盖所致, 说明混合物中柠檬苦素还是以晶体形式存在, 没有与白蛋白纳米粒发生相互作用, 与红外光谱分析结果一致; 白蛋白纳米粒没有晶体峰出现, 在 $10^\circ\sim 80^\circ$ 范围内只有一个宽峰, 而柠檬苦素白蛋白纳米粒也是仅有一个宽峰, 柠檬苦素的晶体峰基本消失, 结合前面红外光谱结果可知, 柠檬苦素是以无定型或者无序状态被包裹在白蛋白中, 这与多西紫衫醇白蛋白纳米粒^[21]、维生素H白蛋白纳米粒^[22]等X射线衍射分析结果相似。



a. 柠檬苦素 b. 白蛋白纳米冻干样 c. 柠檬苦素白蛋白纳米冻干样 d. 白蛋白纳米冻干样与柠檬苦素物理混合

图6 X衍射光谱检测结果

Figure 6 X-ray diffraction spectrum detection results

2.7 稳定性

如图7所示, 4°C 环境下, 随着时间的增加, 柠檬苦素白蛋白纳米粒的平均粒径及其PDI值均缓慢增加, 平均粒径从最初的 $(152.2\pm 0.5)\text{ nm}$, 贮藏25 d后, 其平均粒径增加至 $(202.6\pm 0.2)\text{ nm}$, 这与姜黄素白蛋白纳米粒^[23]的贮藏稳定性变化趋势一致, 柠檬苦素白蛋白纳米粒平均粒径随着时间的增加而增加, 原因可能在于小粒子表面的分子为降低表面能而脱离小粒子, 并通过溶液扩散吸附到大粒子表面导致粒径增加, 即奥斯特瓦尔德熟化现象^[23-24], 这也表明柠檬苦素白蛋白纳米粒在 4°C 环境中稳定性良好。

3 结论

采用去溶剂—化学交联法成功制备柠檬苦素白蛋白

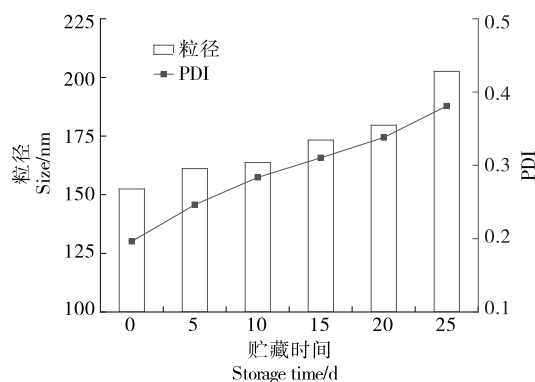


图7 柠檬苦素白蛋白纳米粒贮藏稳定性检测结果

Figure 7 Storage stability test results of limonin-albumin nanoparticles

纳米, 相较于以大豆卵磷脂、硬脂酸和4.5%泊洛沙姆188为原料, 采用薄膜超声法制备的柠檬苦素固体脂质纳米粒^[25]、以丁香酚为油相, 石油蜡为乳化抑制剂, 采用两步乳化法制备负载柠檬苦素的水包油纳米乳液^[26]、以大豆卵磷脂和聚乙烯吡咯酮K30为原料, 采用纳米沉淀法制备的柠檬苦素纳米混悬剂^[20], 该法制备的柠檬苦素白蛋白纳米粒具有操作相对简单、成本低、包埋载体更安全及载体可生物降解等优点。

研究通过单因素及响应面法优化了柠檬苦素白蛋白纳米粒的制备工艺, 当牛血清白蛋白添加量为64 mg, 柠檬苦素添加量为4 mg, 醇水体积比为5:1, 交联剂添加量为125 μL 时, 柠檬苦素白蛋白纳米粒呈规则圆球形, 其平均粒径为 $(152.2\pm 0.5)\text{ nm}$, PDI为 0.196 ± 0.026 , 包埋率为 $(79.21\pm 0.36)\%$; 红外光谱及X射线衍射结果表明, 柠檬苦素以无定型或者无序状态成功被牛血清白蛋白包埋; 该法制备的柠檬苦素白蛋白纳米粒在 4°C 环境下稳定性良好。

参考文献

- [1] 晏敏, 周宇, 贺肖寒, 等. 柑橘籽中柠檬苦素及类似物的生物活性研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(2): 290-296.
- YAN M, ZHOU Y, HE X H, et al. Research progress on the bioactivity of limonin and its analogues in citrus[J]. Food and Fermentation Industries, 2018, 44(2): 290-296.
- [2] 罗喜荣, 任荣, 钱志瑶, 等. HPLC法测定柠檬苦素的平衡溶解度和表观油水分配系数[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(10): 1711-1714.
- LUO X R, REN R, QIAN Z Y, et al. HPLC determination of equilibrium solubility and apparent oil/water partition coefficient of limonin[J]. Journal of Food and Drug Analysis, 2013, 33(10): 1711-1714.
- [3] 张亚杰, 徐金帅, 邹波, 等. 柚皮苷/柠檬苦素微胶囊的制备、结构分析及特性研究[J]. 食品工业科技, 2021, 42(18): 209-217.

- ZHANG Y J, XU J S, ZHOU B, et al. Preparation, structural analysis and properties of naringin/limonin microcapsules [J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(18): 209-217.
- [4] 黄婷, 范远景, 孟静, 等. 正交试验优化灵芝三萜白蛋白纳米体制备工艺及其分子表征[J]. 食品科学, 2015, 36(10): 49-53.
- HUANG T, FAN Y J, MENG J, et al. Optimization of the preparation procedure and molecular characterization of *Ganoderma lucidum* triterpenoids-bovine serum albumin nanoparticles by orthogonal array design[J]. Food Science, 2015, 36(10): 49-53.
- [5] 陶妙婴, 王佳瑜. 星点设计一效应面法优化姜黄素牛血清白蛋白纳米粒的制备工艺[J]. 中国药师, 2019, 22(10): 1 841-1 845.
- TAO M Y, WANG J Y. Preparation optimization of curcumin bovine serum albumin nanoparticles by central composite design and response surface method[J]. China Pharmacist, 2019, 22(10): 1 841-1 845.
- [6] 林晓霞, 何应畅, 尤蓉. 熊果苷纳米粒的制备及用于烧伤皮肤修复研究[J]. 华南师范大学学报(自然科学版), 2021, 53(5): 62-67.
- LIN X X, HE Y C, YOU R. The preparation of arb-BSA-NP nanoparticles and their application to burn injury repair[J]. Journal of South China Normal University (Natural Science Edition), 2021, 53(5): 62-67.
- [7] 武小明, 李丽惠, 霍嘉颖, 等. 降龙涎二醇与牛血清白蛋白的相互作用研究[J]. 现代食品科技, 2019, 35(5): 124-130.
- WU X M, LI L H, HUO J Y, et al. Study on the interaction between ambradiol and bovine serum albumin[J]. Modern Food Science and Technology, 2019, 35(5): 124-130.
- [8] 光翠娥, 桑尚源, 干建平, 等. 光谱法及分子模拟分析大豆皂苷 II 与牛血清白蛋白的相互作用[J]. 食品与生物技术学报, 2018, 37(1): 15-19.
- GUANG C E, SANG S Y, GAN J P, et al. Molecular interaction between soyasaponin II and bovine serum albumin determined by spectrometric and molecular modeling methods[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2018, 37(1): 15-19.
- [9] TARR B D, SAMBANDAN T G, YALKOWSKY S H. A new parenteral emulsion for the administration of taxol [J]. Pharmaceutical Research, 1987, 4(2): 162-165.
- [10] 陈杨玲, 焦叶, 崔波, 等. 蛋白基植物多酚纳米运输载体研究进展[J]. 食品与机械, 2022, 38(4): 8-14.
- CHEN Y L, JIAO Y, CUI B, et al. Research progress of protein-based plant polyphenol nano-delivery carriers [J]. Food & Machinery, 2022, 38(4): 8-14.
- [11] 李艳, 蓝锦晓, 罗成. 白蛋白纳米颗粒的制备研究进展[J]. 中国生物医学工程学报, 2019, 38(1): 112-119.
- LI Y, LAN J X, LUO C. Recent advances in preparation of albumin nanoparticle systems [J]. Chinese Journal of Biomedical Engineering, 2019, 38(1): 112-119.
- [12] 梁鑫富, 董庆亮. 光谱法结合分子对接技术研究柠檬苦素与牛血清白蛋白的相互作用[J/OL]. 食品工业科技. (2024-03-21) [2024-05-05]. <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023100285>.
- LIANG X F, DONG Q L. Spectroscopic method combined with molecular docking technique to study the interaction of limonin with bovine serum albumin[J/OL]. Science and Technology of Food Industry. (2024-03-21) [2024-05-05]. <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023100285>.
- [13] PATIL G V. Biopolymer albumin for diagnosis and in drug delivery[J]. Drug Development Research, 2003, 58(3): 219-247.
- [14] 刘致延. 载抗癌药物白蛋白纳米颗粒的制备及性能评价[D]. 泉州: 华侨大学, 2020: 10.
- LIU Z Y. Preparation and performance evaluation of albumin nanoparticles loaded with anticancer drugs[D]. Quanzhou: Huaqiao University, 2020: 10.
- [15] 张雪, 王强, 潘建全, 等. 牡荆素白蛋白纳米粒的制备及其药动学研究[J]. 中国中药杂志, 2023, 48(19): 5 205-5 215.
- ZHANG X, WANG Q, PAN J Q, et al. Preparation of vitexin albumin pharmacokinetic and its pharmacokinetic study[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2023, 48(19): 5 205-5 215.
- [16] 孟鹏. 金柑柠檬苦素类化合物的提取纯化、结构鉴定及生物活性研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2013: 10.
- MENG P. Extraction, purification, structure identification and biological activity of cimanthin compounds from kumquat [D]. Fuzhuo: Fujian Agriculture and Forestry University, 2013: 10.
- [17] BRONZE-UHLE E S, COSTA B C, XIMENES V F, et al. Synthetic nanoparticles of bovine serum albumin with entrapped salicylic acid[J]. Nanotechnol Sci Appl, 2017, 10: 11-21.
- [18] BOURASSA P, HASNI I, TAJMIR-RIABI H A. Folic acid complexes with human and bovine serum albumins[J]. Food Chem, 2011, 129(3): 1 148-1 155.
- [19] 张伟利, 李晓婷, 决利利, 等. 柠檬苦素磷脂复合物制备及其体内药动学研究[J]. 中成药, 2023, 45(4): 1 051-1 057.
- ZHANG W L, LI X T, JUE L L, et al. Preparation of limonin phospholipid complex and its in vivo pharmacokinetics[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2023, 45(4): 1 051-1 057.
- [20] 王柯静, 决利利, 常宝珠, 等. 柠檬苦素纳米混悬剂和冻干粉的制备及体外评价[J]. 中国医院药学杂志, 2023, 43(13): 1 471-1 478.
- WANG K J, JUE L L, CHANG B Z, et al. Preparation and in vitro evaluation of limonin nanosuspension and its lyophilized powder[J]. Chinese Journal of Hospital Pharmacy, 2023, 43(13): 1 471-1 478.
- [21] CHENG K, SUN S P, GONG X F. Preparation, characterization, and antiproliferative activities of biotin-decorated docetaxel-loaded bovine serum albumin nanoparticles [J]. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2018, 54(2): e17295.
- [22] WANG D F, LIANG N, KAWASHIMA Y, et al. Biotin-modified bovine serum albumin nanoparticles as a potential drug delivery system for paclitaxel[J]. Journal of Materials Science, 2019, 54(11): 8 613-8 626.

(下转第 232 页)

- [48] 高应娟, 罗舒, 宋怡, 等. 灵芝抗炎机制研究进展[J]. 中国食用菌, 2021, 40(9): 1-4, 10.
- GAO Y J, LUO S, SONG Y, et al. Research progress on anti-inflammatory mechanisms of *Ganoderma lucidum*[J]. *Edible Fungi of China*, 2021, 40(9): 1-4, 10.
- [49] 林伟龙, 李兆安, 蔡金艳. 复方赤灵芝营养粉对小鼠抗疲劳作用和氧化损伤模型小鼠的影响[J]. 广东药科大学学报, 2019, 35(2): 242-245.
- LIN W L, LI Z A, CAI J Y. Effect of compound red *Ganoderma* nutrition powder on anti fatigue and oxidative damage model mice [J]. *Journal of Guangdong Pharmaceutical University*, 2019, 35(2): 242-245.
- [50] 张维珂, 张丛丛. 泰山赤灵芝延缓运动员运动性疲劳的实验研究[J]. 体育科技, 2014, 35(6): 77-78, 87.
- ZHANG W K, ZHANG C C. Experimental study on the effect of Taishan *Ganoderma* on delaying sports fatigue[J]. *Sport Science and Technology*, 2014, 35(6): 77-78, 87.
- [51] 李晨, 吕晨曦, 吴磊. 泰山赤灵芝对重复运动后骨骼肌微损伤的保护作用研究[J]. 泰山医学院学报, 2014, 35(8): 711-716.
- LI C, LU C X, WU L. Study on the protective effect of Taishan *Ganoderma* on skeletal muscle microinjury after repeated exercise [J]. *Journal of Taishan Medical College*, 2014, 35(8): 711-716.
- [52] 李盼, 曾祥权, 李倩倩, 等. 块菌多糖的提取、结构、功能及应用研究进展[J]. 食品与机械, 2024, 40(2): 213-220.
- LI P, ZENG X Q, LI Q Q, et al. Research progress on extraction, structural, functional properties and application of Tuber polysaccharides[J]. *Food & Machinery*, 2024, 40(2): 213-220.
- [53] 张文婧, 刘欢, 李红波, 等. 富硒平菇菌种筛选、发酵优化及菌丝特性评价[J/OL]. 食品与生物技术学报. (2024-03-07) [2024-04-11]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/32.1751.TS.20240304.1100.002.html>.
- ZHANG W J, LIU H, LI H B, et al. Screening, fermentation optimization, and mycelia characterization of selenium-enriched *Pleurotus ostreatus* strains [J/OL]. *Journal of Food Science and Biotechnology*. (2024-03-07) [2024-04-11]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/32.1751.TS.20240304.1100.002.html>.
- [54] ZHAO C, ZHANG C C, ZHENG X, et al. Pharmacological effects of natural *Ganoderma* and its extracts on neurological diseases: a comprehensive review [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 121: 1 160-1 178.
-
- (上接第 198 页)
- [13] 谢佳秀, 巫小媚, 陈红丽, 等. 三七总皂苷脂质体的制备及表征研究[J]. 时珍国医国药, 2021, 32(3): 610-613.
- XIE J X, WU X M, CHEN H L, et al. Preparation and characterization of liposomes of Panax ginseng total saponin[J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 2021, 32(3): 610-613.
- [14] 罗照明. 中国蜂胶中多酚类化合物的研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2013: 11.
- LUO Z M. Polyphenolic composition of Chinese propolis [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2013: 11.
- [15] ILHAMI G, ERCAN B M, HILAL S, et al. Polyphenol contents and antioxidant activity of lyophilized aqueous extract of propolis from Erzurum, Turkey[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2010, 48(8/9): 2 227-2 238.
- [16] 李进, 刘世军, 罗锐, 等. 大枣叶水提醇沉物的抗氧化活性研究[J]. 陕西农业科学, 2023, 69(7): 1-7, 17.
- LI J, LIU S J, LUO R, et al. Antioxidant activity of water-extraction alcohol-precipitation extracts from jujube leaves [J]. *Shaanxi Journal of Agricultural Sciences*, 2023, 69(7): 1-7, 17.
- [17] 陈杰. 不同产地灵芝子实体化学成分及抗氧化活性研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2016: 35-36.
- CHEN J. The components and antioxidant activity of *ganoderma lucidum* from different origins[D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2016: 35-36.
- [18] 孙丽萍, 徐响, 黄少康, 等. 蜂胶不同溶剂萃取物组成和抗氧化性的研究[J]. 食品科学, 2009, 30(21): 75-78.
- SUN L P, XU X, HUANG S K, et al. Chemical compositions and antioxidant activity of different solvent extracts from propolis[J]. *Food Science*, 2009, 30(21): 75-78.
- [19] 谭曜, 方爱琴, 谢建敏, 等. 蜂胶乙醇溶液体外清除羟基自由基能力的测定[J]. 广东化工, 2021, 48(12): 189-190, 182.
- TAN Y, FANG A Q, XIE J M, et al. Study on effect of propolis ethanol solution on scavenging hydroxyl radical in vitro [J]. *Guangdong Chemical Industry*, 2021, 48(12): 189-190, 182.
-
- (上接第 212 页)
- [23] 张鹏, 刘璐, 王虹, 等. 姜黄素白蛋白纳米粒的制备与评价[J]. 中国医院药学杂志, 2018, 38(7): 719-722, 731.
- ZHANG P, LIU R, WANG H, et al. Preparation and preliminary characterization of curcumin albumin nanoparticles [J]. *Chinese Journal of Hospital Pharmacy*, 2018, 38(7): 719-722, 731.
- [24] ISBISTER G K, FRIBERG L E, HACKETT L P, et al. Pharmacokinetics of quetiapine in overdose and the effect of activated charcoal[J]. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 2007, 81(6): 821-827.
- [25] 阮仕洋, 陈慧, 曾凡丽, 等. 柠檬苦素固体脂质纳米粒冻干粉制备及质量评价[J]. 中国医院药学杂志, 2022, 42(23): 2 493-2 499.
- RUAN S Y, CHEN H, ZENG F L, et al. Preparation and quality evaluation of limonin solid lipid nanoparticle lyophilized powder[J]. *Chinese Journal of Hospital Pharmacy*, 2022, 42(23): 2 493-2 499.
- [26] LI Y, ZHAO R N, LI Y, et al. Limonin enhances the antifungal activity of eugenol nanoemulsion against *penicillium italicum* in vitro and in vivo tests[J]. *Microorganisms*, 2021, 9(5): 969.