

异甘草素-玉米肽纳米复合物分子模拟对接、制备及体内外评价

尹元元¹, 耿燕娜¹, 孙晋鹏^{2,3}, 崔 锋^{2,3*}

1. 河南大学淮河医院, 河南 开封 475000

2. 亳州高新科创医药产业技术研究院有限公司, 安徽 亳州 236839

3. 山西锦烁生物医药科技有限公司, 山西 晋中 030600

摘要: 目的 制备异甘草素-玉米肽纳米复合物 (isoliquiritigenin-corn peptide nanocomplexes, ISL-CP-NCs), 考察理化性质及口服药动学行为。方法 分子模拟对接法探究异甘草素与玉米肽结合的相互作用。采用自组装法制备 ISL-CP-NCs, Box-Behnken 设计-效应面法优化 ISL-CP-NCs 处方。透射电子显微镜 (transmission electron microscopy, TEM) 观察 ISL-CP-NCs 形貌, X-射线粉末衍射法 (X-ray powder diffraction, XRPD) 分析异甘草素晶型, 傅里叶变换红外光谱 (Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR) 分析研究异甘草素和玉米肽结合机制。测定 ISL-CP-NCs 饱和溶解度, 透析袋法考察 ISL-CP-NCs 释药行为。SD 大鼠分别 ig 给予异甘草素和 ISL-CP-NCs, 计算主要药动学参数及相对生物利用度。结果 ISL-CP-NCs 最佳处方为甘草素质量浓度为 8.90 mg/mL, 玉米肽质量浓度为 100.00 mg/mL, 制备时间为 2.25 h。ISL-CP-NCs 包封率、载药量、粒径及 ζ 电位分别为 $(88.57 \pm 0.57) \%$ 、 $(7.37 \pm 0.11) \%$ 、 $(84.40 \pm 2.02) \text{ nm}$ 和 $(-21.84 \pm 0.80) \text{ mV}$, 微观形貌为类球形。异甘草素可能与玉米肽之间发生了络合作用, 并使异甘草素转变为无定形态。ISL-CP-NCs 将异甘草素在纯化水、模拟胃、肠液中溶解度分别增加至 233.41、309.61 和 213.48 倍。ISL-CP-NCs 在模拟胃、肠液中 12 h 累积释放度分别提高至 83.83% 和 78.87%, 释药行为符合 Weibull 模型。ISL-CP-NCs 半衰期 ($t_{1/2}$) 延长至 $(4.23 \pm 1.61) \text{ h}$, 达峰时间 ($t_{\max}$) 延后至 $(2.17 \pm 0.56) \text{ h}$, 达峰浓度 ($C_{\max}$) 和相对口服吸收生物利用度分别提高至 3.40 倍和 3.88 倍。结论 ISL-CP-NCs 显著增加了异甘草素的溶解度、释放度及相对生物利用度, 为后续药效学研究奠定实验基础。

关键词: 异甘草素; 玉米肽; Box-Behnken 设计-效应面法; 纳米复合物; 溶解度; 释放度; 相对生物利用度

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)21-7749-13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.21.009

Isoliquiritigenin-corn peptide nanocomplexes: Molecular simulation docking, preparation and *in vitro* and *in vivo* evaluation

YIN Yuanyuan¹, GENG Yanna¹, SUN Jinpeng^{2,3}, CUI Feng^{2,3}

1. Huaihe Hospital of Henan University, Kaifeng 475000, China

2. Bozhou Hi-tech Innovation Pharmaceutical Industry Technology Research Institute Co., Ltd., Bozhou 236839, China

3. Shanxi Jinshuo Biopharmaceutical Technology Co., Ltd., Jinzhong 030600, China

Abstract: Objective To prepare isoliquiritigenin-corn peptide nanocomplexes (ISL-CP-NCs), and study its physicochemical properties and oral pharmacokinetics behavior. **Methods** Molecular simulation docking method was employed to investigate the binding interaction between isoliquiritigenin and corn peptide. Self-assembly method was used to prepare ISL-CP-NCs, Box-Behnken response surface design method (BBD-RSM) was employed to optimize prescriptions of ISL-CP-NCs. Transmission electron microscope (TEM) was employed to observe microscopic appearance of ISL-CP-NCs. X-ray powder diffraction (XRPD) was employed to analyze the crystal form of isoliquiritigenin in ISL-CP-NCs powder, Fourier transform infrared spectrometer (FTIR) was used to study binding mechanism of isoliquiritigenin and corn peptide. Determining the saturated solubility of ISL-CP-NCs, and studying the drug release behavior of ISL-CP-NCs by dialysis bag method. SD rats were administered intragastrically with isoliquiritigenin and ISL-CP-NCs

收稿日期: 2025-07-11

基金项目: 河南省二〇二四年科技发展计划 (242102230118); 山西省中央引导地方科技发展资金项目 (YDZJSX2024B014); 山西省中医药科技创新工程项目 (2023kjzy009)

作者简介: 尹元元 (1988—), 女, 硕士, 从事中药学研究。Tel: (0371)23906791 E-mail: yinyuan1102@126.com

*通信作者: 崔 锋 (1982—), 男, 副研究员, 研究方向为制药新技术。Tel: (0354)3983668 E-mail: CuiF1982@126.com

respectively, and main pharmacokinetic parameters and relative bioavailability were also calculated. **Results** Optimal formulations of ISL-CP-NCs: mass concentration of isoliquiritigenin was 8.90 mg/mL, mass concentration of corn peptide was 100.00 mg/mL and prepare time was 2.25 h. Envelopment efficiency, drug loading, particle size and ζ potential were $(88.57 \pm 0.57)\%$, $(7.37 \pm 0.11)\%$, (84.40 ± 2.02) nm and (-21.84 ± 0.80) mV, respectively. Microscopic morphology of ISL-CP-NCs were spheroidal. Isoglycyrrhizin may have chelated with corn peptide and turned into an amorphous form in ISL-CP-NCs powder. ISL-CP-NCs increased the solubility of isoliquiritigenin in distilled water, simulated gastric fluids and intestinal fluids by 233.41, 309.61 and 213.48 times, respectively. Cumulative drug release of ISL-CP-NCs in simulated gastric and intestinal fluids increased to 83.83% and 78.87% in 12 h, and the drug release behavior was in accordance with Weibull model. The $t_{1/2}$ was prolonged to (4.23 ± 1.61) h, $t_{\max}$ of ISL-CP-NCs was postponed to (2.17 ± 0.56) h, $C_{\max}$ and relative oral bioavailability were increased to 3.40 and 3.88 times, respectively. **Conclusion** ISL-CP-NCs significantly increased the solubility, release rate and relative bioavailability of isoliquiritigenin, which laid an experimental foundation for subsequent pharmacodynamics research.

Key words: isoliquiritigenin; corn peptide; Box-Behnken response surface design method; nanocomplexes; solubility; release rate; relative bioavailability

异甘草素属于羟基查耳酮类化合物, 可从甘草、红血藤、肉豆蔻等植物中提取得到^[1]。药理学研究结果显示, 异甘草素具有抗肿瘤、免疫调节、改善神经功能缺损、降血糖、抗胃溃疡、护肝、镇咳、调血压等作用^[1-3]。天然状态的异甘草素呈黄色粉末, 极难溶于水 (溶解度为 $3.74 \mu\text{g/mL}$)^[4], 溶出度极差, 油水分配系数 ($\lg P$) 为 1.73^[5], 属于生物药剂学分类系统中 II 类药物。异甘草素体内易降解^[6], 稳定性差, 也是外排蛋白底物^[7], 所以极大影响了药物体内吸收程度, 小鼠口服生物利用度仅 11.8%^[8], 导致异甘草素药理活性不能充分发挥。因此, 提高异甘草素溶解度、溶出度及体内稳定性有助于促进异甘草素口服吸收, 目前异甘草素有脂质纳米粒^[7]、脂质体^[9]、纳米乳^[10]、纳米混悬剂^[11]等, 但这些制剂中含有大量化学合成的药物辅料, 随着深入研究发现化学合成药物辅料伴随潜在风险如稳定性、纯度及毒性等极大影响了制剂使用的安全性^[12], 引起了医药行业的审慎关注。

天然来源的成分具有价格低廉、低抗原性、稳定性高、使用安全性好等优势, 应用价值较高。使用天然成分代替化学合成的药物辅料是新型给药系统研究热点^[13-14], 有利于推动中药新药研发高质量发展。玉米肽 (corn peptide, CP) 是由玉米蛋白经过微生物发酵法、酶法改性法等得到的一种生物活性肽, 其结构上富含多种氨基酸, 被人体吸收后有益于组织器官生长及修复, 维持肠道机能等。药理学研究表明玉米肽具有降血糖、抗疲劳、护肝和降血脂等生理功能^[15], 在食品及生物医药等领域颇受关注^[16]。玉米肽结构上氨基酸分为疏水性氨基酸和亲水性氨基酸, 从而使玉米肽具有两亲性特性及自组装倾向^[16], 而且玉米肽主链上的酰胺基, 侧链上

的氨基、羟基和羧基等基团可与药物分子通过氢键、疏水作用力和范德华力等作用结合形成结构稳定的纳米复合物^[17-18], 该复合物遇水后可表现出玉米肽自身的两亲性特性及自组装特点, 从而赋予药物良好的分散性及控释性, 有助于提高药物溶解度、释放度及体内稳定性, 进而为促进药物体内口服吸收、提高生物利用度及药效等奠定基础。玉米肽自身也具有较多的药理活性^[15], 可辅助药物发挥治疗作用、增强药效, 可见玉米肽是一种“药辅合一”的理想材料。因此玉米肽非常有潜力作为新型药物递送载体, 但目前鲜见在医药领域应用的研究报道^[18]。

本研究以玉米肽作为异甘草素的配体, 制备异甘草素-玉米肽纳米复合物 (isoliquiritigenin-corn peptide nanocomplexes, ISL-CP-NCs), 采用分子模拟对接技术研究异甘草素和玉米肽之间结合倾向及可能的结合位点, 单因素实验结合 Box-Behnken 设计-效应面法 (Box-Behnken design-response surface method, BBD-RSM) 筛选 ISL-CP-NCs 处方, 并对结合机制、药物晶型、溶解度及释药行为等进行研究。以异甘草素为参考, 对 ISL-CP-NCs 口服药动学进行考察, 期望为玉米肽作为新型药物递送载体提供参考, 也为异甘草素新型制剂研究提供借鉴。

1 仪器与材料

1.1 仪器

MSE125P-CE 型电子分析天平, 瑞士 Sartorius 仪器公司; HJ-6AB 型磁力搅拌器, 常州润华电器有限公司; DW-86L578J 型超低温冰箱, 青岛海尔生物医疗股份有限公司; N-1100 型旋转蒸发仪, 日本东京理化株式会社; CS110 型真空冷冻干燥机, 丹麦 Scanlaf 公司; 1200 型高效液相色谱仪 (HPLC),

美国 Agilent 公司; JEM-7700/FLASH 型透射电子显微镜 (TEM), 日本 JEOL 公司; XRD-2 型 X 射线粉末衍射仪, 北京普析通用仪器有限责任公司; Avanti30 型高速离心机, 美国 Beckman 公司; ZS-90 型粒度测定仪, 英国 Malvern 公司; BSC-150 型恒温恒湿箱, 上海博讯实业有限公司医疗设备厂; RC806D 型溶出仪, 天津天大天发科技有限公司; VECTOR-22 型傅里叶变换红外光谱仪, 德国 Bruker 公司; QL-901 型涡旋仪, 海门市其林贝尔仪器制造有限公司; CM-24 型氮吹仪, 北京成萌伟业科技有限公司。

1.2 材料与动物

异甘草素对照品, 批号 MUST-22081317, 质量分数 99.2%, 成都曼思特生物科技有限公司; 异甘草素原料药, 批号 220801, 质量分数 96.8%, 麻城市进鑫生物科技有限公司; 玉米肽, 批号 221826, 湖北海嘉生物科技有限公司; 十二烷基磺酸钠, 批号 13120529, 北京索莱宝科技有限公司; 磷酸二氢钾 (批号 20220508)、磷酸 (批号 20231117)、肝素 (批号 20190812), 国药集团化学试剂有限公司; 乙酰苯胺对照品, 批号 100433-202103, 质量分数 99.7%, 中国食品药品检定研究院; 模拟胃液 (批号 20241025)、模拟肠液 (批号 20241120), 广州臻萃质检技术服务有限公司; 乙腈, 批号 I1231229229, 美国 Sigma Aldrich 公司。

SD 大鼠, 雌雄兼具, 体质量 180~200 g, 购自河南省动物实验中心, 生产许可证号 SCXK (豫) 2020-0001。实验过程遵循亳州高新科创医药产业技术研究院有限公司有关实验动物管理规定, 动物伦理批准号: 2023-DW-0310, 符合 3R 原则。

2 方法与结果

2.1 玉米肽与异甘草素分子模拟对接

疏水氨基酸^[17-18]是形成纳米复合物的主要基团。玉米肽共 6 条肽链段^[17], 本研究选择疏水氨基酸最多的肽链段进行模拟对接, 即 Ser-Leu-Ile-Asn-Pro-Val-Leu-Ser-Arg-Gln-Gln-Pro-Ile-Val-Gly-Gly-Ala (SLINPVLSRQQPIVGGA)。使用 Discovery Studio 2022 中半柔性对接模式, 对玉米肽肽链段与异甘草素进行分子模拟对接, 其中异甘草素三维结构从 PubChem 数据库下载, 玉米肽肽链段在 Discovery Studio 2022 上构建。分别将异甘草素和玉米肽肽链段分别设置为配体和受体, 对接区域的盒子大小设定为 4.0 nm×4.0 nm×4.0 nm 正方形口袋, 以包含

整个肽链段结构, 格点之间的距离设定为 37.5 pm, 运算次数为 100。使用 pymol 进行可视化分析并绘制三维图, 使用 ligplus 绘制二维图。以结合能作为判断依据, 结合能越低表示结合构象越稳定, 对接结合能小于 -5.0 kcal/mol (1 kcal=4.184 kJ) 表示结合活性良好, 对接结合能小于 -7.0 kcal/mol 表示结合活性高^[19-20]。研究结果显示, 参与对接的玉米肽肽链段与异甘草素结合能为 -7.23 kcal/mol, 表明两者之间亲和力较强, 分子间主要作用力为氢键和疏水作用力。玉米肽肽链段上的精氨酸 (Arg)、脯氨酸 (Pro)、异亮氨酸 (Ile) 和亮氨酸 (Leu) 均可能是异甘草素的结合位点 (图 1)。

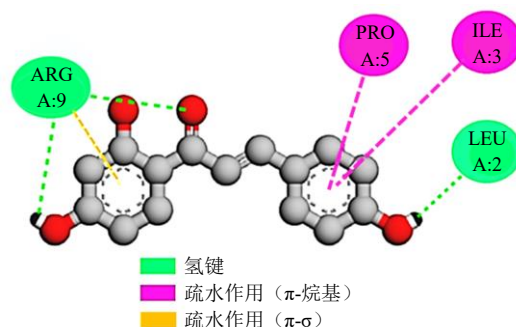


图 1 异甘草素和玉米肽分子对接 2D 示意图

Fig. 1 Molecular docking 2D schematic diagram of isoliquiritigenin and corn peptide

2.2 ISL-CP-NCs 的制备

取处方量的玉米肽粉末溶于 50 mL 纯化水中, 在一定水浴温度下 600 r/min 磁力搅拌至完全溶解, 即得一定质量浓度的玉米肽水溶液。另取异甘草素 50 mg 溶于 10 mL 无水乙醇, 缓慢滴加至玉米肽水溶液中, 600 r/min 磁力搅拌一定时间。减压条件下旋转蒸发除去乙醇, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过除去不溶性颗粒, 补充纯化水至 50 mL, 即得 ISL-CP-NCs 混悬液。于 -45 °C 超低温冰箱中预冻 3 d, 置 -30 °C 冻干机中干燥 2 d 即得 ISL-CP-NCs 粉末。不含异甘草素的阴性样品同法制备。

2.3 ISL-CP-NCs 中异甘草素含量测定

2.3.1 色谱条件 色谱柱为 Diamonsil C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 检测波长为 372 nm; 柱温为 35 °C; 流动相为乙腈-水 (40:60); 体积流量为 1.0 mL/min, 进样量为 20 μL。

2.3.2 线性关系考察 精密称取异甘草素对照品 10.44 mg 至 50 mL 量瓶中, 加乙腈溶解后稀释至刻度, 摇匀即得 208.80 μg/mL 对照品储备液, 密封备用。精密取异甘草素储备液适量, 采用乙腈-水混合

溶剂(40:60)稀释配制成 10 440.0、5 220.0、2 610.0、1 044.0、208.8、52.2 ng/mL 系列异甘草素对照品溶液,分别按照“2.3.1”项下色谱条件测定各个质量浓度(X)异甘草素的峰面积(Y),回归得线方程: $Y=346.73 X+21.62$, $r=0.999 8$,因此异甘草素线性质量浓度区间为 52.2~10 440.0 ng/mL。

2.3.3 ISL-CP-NCs 供试品溶液的制备 ISL-CP-NCs 混悬液 1 mL 置于离心管中,加入 3 mL 醋酸乙酯振荡 1 min,4 °C 下 8 000× g 离心 5 min,取出上层有机相。重复提取 3 次,合并有机相至 10 mL 量瓶,加入醋酸乙酯稀释定容。精密取 1 mL 上清液至 25 mL 量瓶中,加乙腈稀释定容即得 ISL-CP-NCs 供试品溶液,密封待测。

2.3.4 专属性考察 取阴性样品,按照“2.3.3”项下方法制备阴性样品溶液,另取异甘草素对照品溶液(2.610 0 μ g/mL)和 ISL-CP-NCs 供试品溶液,分别按照“2.3.1”项下色谱条件进样测定。结果见图 2,异甘草素色谱峰专属性高。

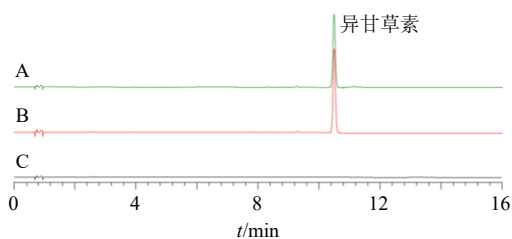


图 2 ISL-CP-NCs (A)、异甘草素对照品溶液 (B) 和阴性样品溶液 (C) 的 HPLC 图

Fig. 2 HPLC of ISL-CP-NCs (A), isoliquiritigenin reference substance (B) and negative sample solution (C)

2.3.5 精密度考察 取质量浓度分别为 10 440.0、2 610.0、52.2 ng/mL 异甘草素对照品溶液,同 1 d 内按照“2.3.1”项下色谱条件进样测定 6 次,异甘草素峰面积的 RSD 分别为 0.22%、0.48%、0.36%,表明日内精密度良好;取质量浓度分别为 10 440.0、2 610.0、52.2 ng/mL 异甘草素对照品溶液,每天按照“2.3.1”项下色谱条件进样测定 1 次,连续测试 6 d,异甘草素峰面积的 RSD 分别为 0.43%、0.25%、0.82%,表明日间精密度良好。

2.3.6 稳定性考察 取 ISL-CP-NCs 供试品溶液置于高效液相色谱仪的 25 °C 温控进样盘中,于制备后 0、2、4、6、12、24 h,按照“2.3.1”项下色谱条件进样测定,异甘草素峰面积的 RSD 为 0.77%,表明 ISL-CP-NCs 供试品溶液稳定性良好。

2.3.7 重复性考察 取 ISL-CP-NCs 混悬液,按照

“2.3.3”项下方法制备 6 份供试品溶液,按照“2.3.1”项下色谱条件进样测定,异甘草素质量浓度的 RSD 为 1.40%,结果表明该方法重复性良好。

2.3.8 加样回收率考察 分别精密吸取 ISL-CP-NCs 混悬液 0.5 mL,置于 10 mL 量瓶中,共 9 份,每组 3 份,分为低、中、高 3 组,分别加入质量浓度为 208.80 μ g/mL 异甘草素对照溶液 1.5、2.5、3.5 mL,摇匀后按照“2.3.3”项下方法制备供试品溶液,测定异甘草素总含量,计算得异甘草素回收率为 100.12%,RSD 值分别为 1.56%,因此该方法可用于准确测定 ISL-CP-NCs 中异甘草素含量。

2.3.9 样品测定 取各待测样品,按照“2.3.3”项下方法制备供试品溶液,按照“2.3.1”项下色谱条件进样测定,计算异甘草素含量。

2.4 ISL-CP-NCs 粒径、 ζ 电位、包封率和载药量测定

取 ISL-CP-NCs 混悬液 1 mL,经 0.45 μ m 微孔滤膜滤过,除去未形成 ISL-CP-NCs 的原料药,在续滤液中加入 3 mL 醋酸乙酯,振荡 1 min,4 °C 下 8 000× g 离心 5 min,取出上层有机相。重复提取 3 次,合并有机相至 10 mL 量瓶中,加入醋酸乙酯稀释定容,按照“2.3.3”项下方法制备供试品溶液,并测定被包封甘草素的量($M_{\text{包封量}}$)^[18]。以异甘草素总投药量($M_{\text{总}}$)为参考计算 ISL-CP-NCs 包封率。ISL-CP-NCs 混悬液直接冻干,称定质量($M_{\text{总质量}}$),计算 ISL-CP-NCs 载药量。

$$\text{包封率} = M_{\text{包封量}} / M_{\text{总}}$$

$$\text{载药量} = M_{\text{包封量}} / M_{\text{总质量}}$$

取 ISL-CP-NCs 混悬液用纯化水稀释 40 倍,震荡混匀,取适量至样品池中,于粒度分析仪上测定粒径和分散性指数(polydispersity index, PDI),每份样品测定 3 次。另取适量 ISL-CP-NCs 混悬液至 ζ 电位电槽中,测定 ζ 电位,每份样品测定 3 次。

2.5 单因素考察 ISL-CP-NCs 处方工艺

2.5.1 异甘草素质量浓度的考察 固定玉米肽质量浓度为 100 mg/mL,水浴温度为 70 °C,制备时间为 2 h 条件下考察异甘草素质量浓度对 ISL-CP-NCs 包封率、载药量、粒径和 ζ 电位的影响。结果见表 1,随着异甘草素质量浓度的增加,ISL-CP-NCs 包封率逐渐下降,主要是由于异甘草素质量浓度越大时异甘草素用量越大,导致部分药物未能与玉米肽形成 ISL-CP-NCs^[21],从而影响了包封率;随着异甘草素质量浓度的增加载药量逐渐增加,同时粒径

表 1 异甘草素质量浓度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effects of isoliquiritigenin concentration ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

异甘草素/ (mg·mL ⁻¹)	包封率/%	载药量/%	粒径/nm	ζ 电位/mV
3	85.91±0.91	3.33±0.12	80.19±4.21	-20.17±1.11
6	86.43±1.03	4.76±0.17	86.22±2.58	-20.86±1.09
9	86.77±1.24	7.18±0.20	87.58±5.77	-20.04±1.50
12	74.94±0.97	7.94±0.18	104.70±7.12	-19.85±0.98
15	70.87±1.09	9.09±0.16	128.14±5.66	-16.71±1.36

呈增长趋势, 而 ζ 电位绝对值呈下降趋势。可见异甘草素质量浓度对 ISL-CP-NCs 较大, 在保证 ISL-CP-NCs 包封率大于 80% 前提下兼顾载药量、粒径和 ζ 电位绝对值, 故后续对异甘草素质量浓度 6~12 mg/mL 进行优化。

2.5.2 玉米肽质量浓度的考察 固定异甘草素质量浓度为 9 mg/mL, 水浴温度为 70 ℃, 制备时间为 2 h 条件下考察玉米肽质量浓度对 ISL-CP-NCs 的影响。结果见表 2, ISL-CP-NCs 包封率随着玉米肽质量浓度增加而逐渐增加, 说明增加玉米肽质量浓度可提高包封率, 但载药量总体呈下降趋势。ISL-CP-NCs 粒径随着玉米肽质量浓度增加而逐渐增长, 可能是玉米肽质量浓度越大形成的 ISL-CP-NCs 数量越多, 发生相互粘连、融合几率越大^[13], 导致粒径变大, 但玉米肽质量浓度对 ζ 电位影响相对较小。可见玉米肽质量浓度对 ISL-CP-NCs 包封率、载药量和粒径影响较大, 为尽量减少玉米肽用量, 并确保 ISL-CP-NCs 包封率大于 80%, 故后续对玉米肽质量浓度 80~120 mg/mL 进行优化。

2.5.3 制备温度的考察 固定异甘草素质量浓度为 9 mg/mL, 玉米肽质量浓度 100 mg/mL, 制备时间为 2 h 条件下考察水浴温度对 ISL-CP-NCs 的影响。结果见表 3, 随着制备温度的升高 ISL-CP-NCs 包封率和载药量均呈先增加后下降趋势, 可能是制备温度较低时不利于异甘草素与玉米肽形成 ISL-CP-NCs,

表 2 玉米肽质量浓度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effects of CP concentration ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

玉米肽/ (mg·mL ⁻¹)	包封率/%	载药量/%	粒径/nm	ζ 电位/mV
60	65.20±1.11	8.36±0.13	85.87±5.04	-20.27±0.73
80	74.96±0.91	7.51±0.19	84.93±7.66	-19.92±0.96
100	87.14±0.92	7.09±0.12	88.62±4.41	-19.89±1.04
120	87.58±1.04	6.14±0.22	113.46±6.59	-20.43±1.09
140	87.39±1.17	5.28±0.14	149.90±6.48	-19.98±1.20

表 3 水浴温度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effects of bath temperature ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

制备温度/ ℃	包封率/%	载药量/%	粒径/nm	ζ 电位/mV
50	70.49±1.06	5.67±0.14	106.16±5.39	-16.66±0.82
60	85.32±1.01	6.72±0.20	94.69±6.39	-19.47±1.07
70	87.80±0.96	7.18±0.13	85.07±7.04	-21.02±1.34
80	84.07±1.08	6.78±0.15	85.04±5.40	-20.79±0.92
90	77.94±1.18	6.23±0.18	91.93±6.57	-18.63±1.05

但制备温度过高时异甘草素易降解^[22], 使包封率和载药量下降。粒径随着制备温度升高呈先下降后增长趋势, 而 ζ 电位绝对值呈现先增大后变小情况。可见制备温度对 ISL-CP-NCs 有较大影响, 由于制备温度为 70 ℃ 时包封率、载药量和 ζ 电位绝对值均较大, 而粒径相对较小, 故选择为 70 ℃ 来制备 ISL-CP-NCs。

2.5.4 制备时间的考察 固定异甘草素质量浓度为 9 mg/mL, 玉米肽质量浓度 100 mg/mL, 制备温度为 70 ℃ 条件下考察制备时间对 ISL-CP-NCs 的影响。结果见表 4, 随着制备时间的延长包封率和载药量均呈先增加后下降趋势, 可能是适当的制备时间利于形成 ISL-CP-NCs, 但制备时间过长时易导致异甘草素降解^[22], 也易影响异甘草素和玉米肽之间的结合稳定性^[15], 进而影响了包封率和载药量。随着制备时间的延长粒径呈先变小后增大, 时间过长时 ζ 电位绝对值下降。由于制备时间为 2.0 h 时 ISL-CP-NCs 包封率、载药量和 ζ 电位绝对值相对较大, 粒径相对较小, 故后续以 2.0 h 为中心, 对制备时间 1.5~2.5 h 进行优化。

2.6 BBD-RSM 优化 ISL-CP-NCs 处方

2.6.1 试验方案 选择异甘草素质量浓度 (X_1)、玉米肽质量浓度 (X_2) 及制备时间 (X_3) 作为 ISL-CP-NCs 主要影响因素, X_1 、 X_2 和 X_3 水平设置见表 5。采用包封率 (Y_1)、载药量 (Y_2)、粒径 (Y_3) 控制质量^[13], 并选为 ISL-CP-NCs 的优化指标。为使 ISL-

表 4 搅拌时间的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effects of stirring time ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

制备时间/ h	包封率/%	载药量/%	粒径/nm	ζ 电位/mV
1.0	65.79±0.99	5.41±0.12	97.71±4.64	-19.74±1.07
1.5	78.71±0.90	6.17±0.19	93.60±5.29	-19.96±0.94
2.0	87.54±1.19	7.21±0.15	84.69±6.54	-20.53±1.46
2.5	81.16±0.84	6.49±0.24	89.23±4.47	-18.38±1.19
3.0	79.93±1.05	6.33±0.21	122.97±6.59	-17.84±0.88

表 5 BBD-RSM 试验因素水平、试验设计与结果 ($n=3$)Table 5 Factor level, experimental design and results of BBD-RSM experiment ($n=3$)

序号	$X_1/$ (mg·mL ⁻¹)	$X_2/$ (mg·mL ⁻¹)	X_3/h	$Y_1/\%$	$Y_2/\%$	粒径/ nm	OD	序号	$X_1/$ (mg·mL ⁻¹)	$X_2/$ (mg·mL ⁻¹)	X_3/h	$Y_1/\%$	$Y_2/\%$	粒径/ nm	OD
1	12 (+1)	100 (0)	2.5 (+1)	74.36	7.55	118.14	0.502	10	6	80	2.0	81.36	5.77	114.72	0.522
2	12	80 (-1)	2.0 (0)	67.91	8.61	158.48	0	11	9	100	2.0	85.71	7.07	84.36	0.822
3	6 (-1)	100	1.5 (-1)	78.72	4.29	94.83	0.298	12	12	100	1.5	70.82	7.66	120.64	0.381
4	9 (0)	100	2.0	85.54	7.24	87.36	0.822	13	9	120	1.5	80.37	6.42	124.29	0.521
5	9	80	1.5	72.36	5.92	114.59	0.371	14	9	100	2.0	88.15	6.94	82.15	0.854
6	12	120 (+1)	2.0	78.58	6.89	137.52	0.446	15	6	120	2.0	84.94	4.01	117.76	0
7	9	100	2.0	88.64	7.23	84.27	0.880	16	9	80	2.5	78.23	8.25	126.43	0.578
8	9	100	2.0	86.79	7.11	88.46	0.826	17	9	120	2.5	81.78	5.36	123.52	0.448
9	6	100	2.5	80.42	4.95	90.64	0.479								

CP-NCs 包封率和载药量较高,同时粒径较小,故采用包封率、载药量和粒径 3 个指标的总评归一值 (overall desirability, OD) 进行评价,计算过程为 $d_{\text{包封率}}$ 和 $d_{\text{载药量}}$ 采用 $d_{\text{包封率或载药量}} = (M_i - M_{\min}) / (M_{\max} - M_{\min})$ 计算; 粒径 $d_{\text{粒径}}$ 采用 $d_{\text{粒径}} = (M_{\max} - M_i) / (M_{\max} - M_{\min})$ 计算, 式中 M_i 代表实际值, $M_{\max}$ 和 $M_{\min}$ 分别代表该组实验中最大值和最小值; $OD = (d_{\text{包封率}} d_{\text{载药量}} d_{\text{粒径}})^{1/3}$ 。按实验方案分别制备 ISL-CP-NCs, 测定的包封率、载药量和粒径, 并计算 OD 值, 实验方案及测得结果见表 5。

2.6.2 模型拟合及方差分析 以 OD 为因变量 Y , 使用 Design Expert V12.0 软件对实验结果拟合, 得 2 次 3 项式方程为 $Y = 0.84 - 3.72 \times 10^{-3} X_1 - 7.12 \times 10^{-3} X_2 + 0.05 X_3 + 0.24 X_1 X_2 - 0.02 X_1 X_3 - 0.07 X_2 X_3 - 0.33 X_1^2 - 0.27 X_2^2 - 0.09 X_3^2$, 方差分析结果见表 6, 模型 $P < 0.000 1$, 说明建立的数学模型具有极显著性意义, 判定系数 R^2 和调整判定系数 R_{adj}^2 分别为 0.990 1 和 0.977 5, 说明模拟结果与实验结果相关性良好。模型失拟项 $P = 0.088 7$ ($P > 0.05$), 说明干扰因素无显著性影响, 拟合结果可信度较高。OD 数学模型中, $X_2 X_3$ 具有显著性差异 ($P < 0.05$), X_3 、 X_1^2 、 X_2^2 和 X_3^2 具有极显著性差异 ($P < 0.01$)。

2.6.3 响应面及处方工艺确定 分别绘制自变量 $X_1 X_2$ 、 $X_1 X_3$ 、 $X_2 X_3$ 与因变量 OD 响应面图和等高线图, 结果见图 3。随着 X_1 、 X_2 、 X_3 任意 2 个自变量增加, OD 值均呈先增加后下降趋势。等高线图结果表明, 甘草素质量浓度和玉米肽质量浓度的曲面更为陡峭, 等高线更密集, 表明交互作用较强; 玉米肽质量浓度与制备时间的交互作用次之, 而甘草素质量浓度和制备时间交互作用相对最小, 与表 6 中方差分析 $X_1 X_2$ 、 $X_1 X_3$ 和 $X_2 X_3$ 的 F 值的大小相符。

表 6 OD 方差分析

Table 6 Variance analysis of OD

项目	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	1.15	9	0.13	78.18	<0.000 1
X_1	1.11×10^{-4}	1	1.11×10^{-4}	0.07	0.802 1
X_2	4.05×10^{-4}	1	4.05×10^{-4}	0.25	0.634 2
X_3	0.02	1	0.02	14.47	0.006 7
$X_1 X_2$	0.23	1	0.23	142.98	<0.000 1
$X_1 X_3$	8.79×10^{-4}	1	8.79×10^{-4}	0.54	0.487 6
$X_2 X_3$	0.02	1	0.02	11.85	0.010 8
X_1^2	0.46	1	0.46	282.77	<0.000 1
X_2^2	0.30	1	0.30	183.41	<0.000 1
X_3^2	0.04	1	0.04	22.79	0.002 0
残差	0.01	7	1.64×10^{-3}		
失拟项	8.86×10^{-3}	3	2.95×10^{-3}	4.55	0.088 7
纯偏差	2.60×10^{-3}	4	6.50×10^{-4}		
总离差	1.16	16			

优化 ISL-CP-NCs 处方时设置 OD 区间为 0~1, 得到最佳处方为甘草素质量浓度 (X_1) 为 8.92 mg/mL, 玉米肽质量浓度 (X_2) 为 99.69 mg/mL, 制备时间 (X_3) 为 2.26 h, 预测 OD 为 0.894。为简便操作, 甘草素质量浓度 (X_1) 调整为 8.90 mg/mL, 玉米肽质量浓度 (X_2) 调整为 100.00 mg/mL, 制备时间 (X_3) 调整为 2.25 h。

2.6.4 处方验证 制备 3 批 ISL-CP-NCs, 包封率、载药量、粒径和实测 OD 值结果见表 7。3 批 ISL-CP-NCs 平均包封率、载药量和粒径分别为 $(88.57 \pm 0.57)\%$ 、 $(7.37 \pm 0.11)\%$ 和 (84.40 ± 2.02) nm, 其中 ISL-CP-NCs 粒径分布见图 4-A。根据预测 OD 值 0.894, 实测 OD 值 (0.890 ± 0.011) 的相对偏差为 -0.45%, 证明建立的数学模型预测性良好。另测得 ISL-CP-NCs 平均 PDI 值为 0.096 ± 0.009 , ζ 电位为

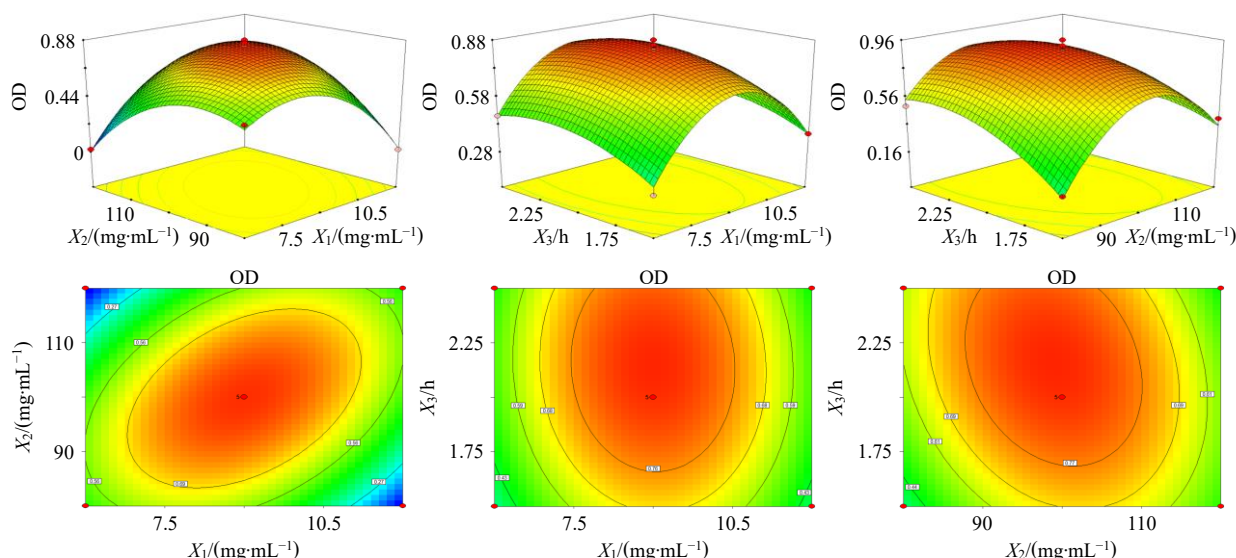


图 3 3 个主要影响因素对 OD 值的响应面和等高线图

Fig. 3 Response surface and contour map of three main influencing factors on OD value

表 7 处方验证结果及相对偏差 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 7 Results of prescription validation and relative deviation ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

批次	包封率/%	载药量/%	粒径/nm	OD
1	88.73	7.36	83.62	0.895
2	87.93	7.27	82.89	0.878
3	89.04	7.48	86.70	0.898

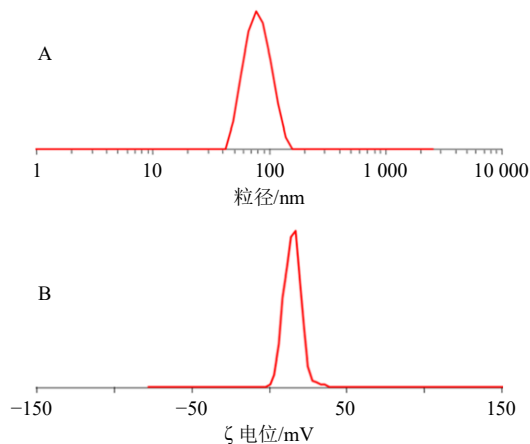


图 4 ISL-CP-NCs 粒径分布 (A) 和 ζ 电位 (B)

Fig. 4 Distribution diagram of particle size (A) and ζ potential (B) of ISL-CP-NCs

(-21.84 ± 0.80) mV, ζ 电位见图 4-B。

取 ISL-CP-NCs 混悬液和纯化水置于比色皿中，红色激光笔侧面照射，结果见图 5，ISL-CP-NCs 混悬液可观察到明亮的光路即丁达尔现象，说明体系中存在较多的纳米颗粒，而纯化水无丁达尔现象。

2.7 ISL-CP-NCs 粉末的制备及溶解度测定

2.7.1 ISL-CP-NCs 粉末的制备 取 ISL-CP-NCs 混

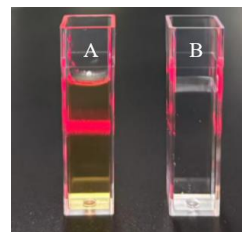


图 5 ISL-CP-NCs (A) 和纯化水 (B) 的丁达尔实验

Fig. 5 Tyndall experiments of ISL-CP-NCs (A) and purified water (B)

悬液，按照 3 mL/瓶分装至西林瓶中，置 $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温度下预冻 2 d，取出，置冷阱温度为 $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻干机中 3 d，取出，即得 ISL-CP-NCs 粉末。ISL-CP-NCs 混悬液、ISL-CP-NCs 冻干粉及纯化水重新分散后样品外观见图 6。ISL-CP-NCs 冻干粉重新分散后的包封率、载药量、粒径和 ζ 电位分别为 (84.96 ± 0.19) %、(7.03 ± 0.08) %、(96.13 ± 4.07) nm 和 (-19.66 ± 0.95) mV，包封率、载药量和 ζ 电位绝对值有所下降，但包封率仍大于 80%；粒径虽有所增长，但仍

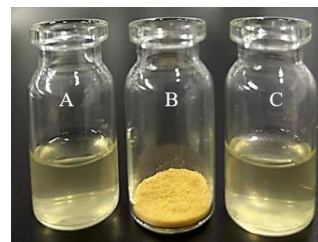


图 6 ISL-CP-NCs 混悬液 (A)、粉末 (B) 和纯化水重新分散 (C) 的外观

Fig. 6 Appearance of ISL-CP-NCs suspension (A), powder (B) and purified water redispersed (C)

小于 100 nm。

2.7.2 ISL-CP-NCs 粉末溶解度测定 取过量异甘草素原料药、物理混合物（异甘草素与玉米肽用量比同 ISL-CP-NCs 粉末）和 ISL-CP-NCs 粉末，分别置于纯化水中即得混悬液，超声 15 min（仍有异甘草素沉淀），于 25 °C 水浴中 600 r/min 磁力搅拌 3 天后取出，4 °C 下 8 000×g 离心 10 min，取上清液测定异甘草素浓度。同法测定异甘草素原料药、物理混合物和 ISL-CP-NCs 粉末在模拟胃液（pH 2.0）和模拟肠液（pH 6.8）溶解度。结果见表 8，物理混合物极大提高了异甘草素在纯化水及模拟胃肠液中的溶解度（ $P<0.01$ ），分别提高至 39.66、142.75、93.26 倍。ISL-CP-NCs 粉末将异甘草素在纯化水、模拟胃液和模拟肠液中溶解度分别提高至 233.41、309.61、213.48 倍，溶解度提高幅度远高于物理混合物（ $P<0.01$ ）。

表 8 异甘草素、物理混合物及 ISL-CP-NCs 粉末溶解度结果（ $\bar{x} \pm s, n=3$ ）

介质	溶解度/（ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ）		
	异甘草素	物理混合物	ISL-CP-NCs 粉末
纯化水	2.45 ± 0.09	$97.16 \pm 0.22^{**}$	$571.86 \pm 12.43^{**\#}$
模拟胃液	1.03 ± 0.05	$147.03 \pm 0.23^{**}$	$318.90 \pm 10.16^{**\#}$
模拟肠液	3.14 ± 0.18	$292.85 \pm 0.16^{**}$	$670.34 \pm 16.49^{**\#}$

与异甘草素比较： $^{**}P<0.01$ ；与物理混合物比较： $^{\#}P<0.01$ 。

$^{**}P<0.01$ vs isoliquiritigenin; $^{\#}P<0.01$ vs physical mixture.

2.8 TEM 观察

取适量 ISL-CP-NCs 粉末，加至蒸馏水中复溶，加入质量分数为 2.5% 戊二醛固定液，静置过夜，取 3 滴混悬液至铜网，1.0% 磷钨酸钠染色，晾干。置于 TEM 下观察 ISL-CP-NCs 形貌。结果见图 7，ISL-CP-NCs 粉末重新分散后的形貌为球形，分散性良好，无黏连现象。

2.9 傅里叶变换红外光谱（Fourier transform infrared spectrometer, FT-IR）分析

分别取异甘草素、玉米肽、物理混合物（异甘草素与玉米肽用量比同 ISL-CP-NCs 粉末）和 ISL-CP-NCs 粉末置于玛瑙研钵中，加入适量溴化钾（样品与溴化钾质量比为 100:1），研细后压片。FT-IR 测试条件：光阑为 100.0，环境湿度为 25%，分辨率为 4.0，背景扫描 2 次，样品扫描 16 次。结果见图 8，玉米肽在 3 878.50、3 267.88 cm^{-1} 处出现酰胺键的 N-H 伸缩振动峰；异甘草素在 3 456.78、3 266.17

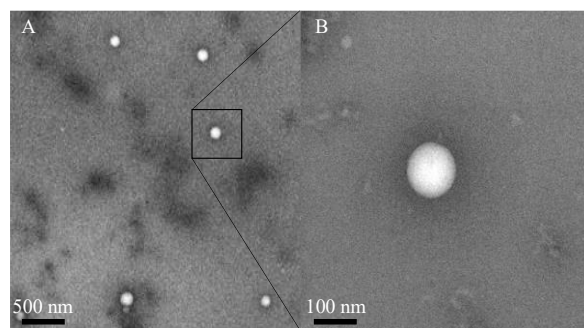


图 7 ISL-CP-NCs 混悬液 (A) 及其局部放大图 (B) 的 TEM 图

Fig. 7 TEM image of ISL-CP-NCs suspension (A) and local enlargement (B)

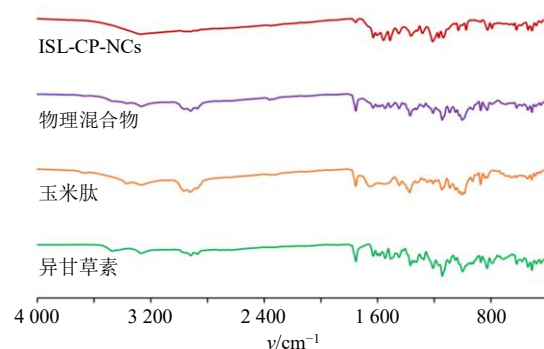


图 8 各个样品的 FT-IR 图

Fig. 8 FT-IR spectroscopy of every sample

cm^{-1} 处出现酚羟基伸缩振动峰，在 1 780.45 cm^{-1} 处出现 C=O 伸缩振动峰。物理混合物的 FT-IR 图谱仅是玉米肽和异甘草素特征吸收峰的简单叠加，说明两者之间未发生络合作用。在 ISL-CP-NCs 的 FT-IR 图谱中，异甘草素在 3 456.78 cm^{-1} 处酚羟基伸缩振动峰消失，在 1 780.45 cm^{-1} 处 C=O 伸缩振动峰明显减弱；而玉米肽在 3 878.50 cm^{-1} 处酰胺键的 N-H 伸缩振动峰消失，因此推测异甘草素分子结构上的酚羟基和羰基与玉米肽酰胺键之间可能发生了氢键络作用^[23]，从而形成了 ISL-CP-NCs。

2.10 X 射线粉末衍射（X-ray powder diffraction, XRPD）分析

取异甘草素、玉米肽、物理混合物（异甘草素与玉米肽用量比同 ISL-CP-NCs 粉末）和 ISL-CP-NCs 粉末适量，分别测试 XRPD，测试条件：Cu-K α 靶，速度为 3°/min，范围为 2θ 3°~45°，结果见图 9。异甘草素在 12.4°、14.8°、17.8°、21.5°、22.7°、25.3° 等处晶型衍射峰最强，玉米肽无任何晶型峰，表明玉米肽为无定型物质。在异甘草素与玉米肽给物理混合物 XRPD 图谱中仍可见异甘草素的特征衍射峰，在玉米肽掩蔽作用下异甘草素强度晶型衍射

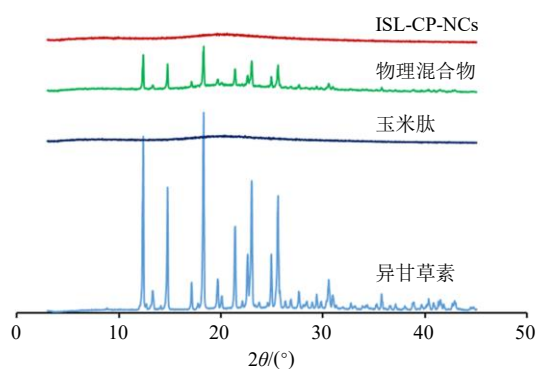


图 9 各个样品的 XRPD 结果

Fig. 9 XRPD results of every sample

峰有所下降,但异甘草素晶型状态仍未改变。在 ISL-CP-NCs 粉末 XRPD 图谱中异甘草素特征衍射峰均消失,说明异甘草素在 ISL-CP-NCs 粉末可能转变为无定型状态。晶型药物的晶格能较大,具有较高的密度和熔点,严重影响了溶解度及溶出速率;而无定型药物需要克服的晶格能较小,可显著提高药物的溶解度、溶出速率及溶出度^[23]。

2.11 pH 值对 ISL-CP-NCs 粒径、PDI 和 ζ 电位的影响

取 ISL-CP-NCs 粉末分别置于 pH 2.0、3.5、5.0、5.5、6.8、7.4 磷酸盐缓冲液 (PBS) 中,震荡使之溶解,置于 37 °C 恒温水浴中孵育 2 h,分别取样测定粒径、PDI 和 ζ 电位,结果见表 9。随着 pH 值的降低, ISL-CP-NCs 粒径和 PDI 值总体呈增大趋势, ζ 电位绝对值总体呈减小趋势,说明 ISL-CP-NCs 在酸性介质中稳定性略低于在碱性介质中的稳定性^[15],但 ISL-CP-NCs 在 pH 2.0 PBS 中孵育 2 h 后粒径仍小于 400 nm,利于 ISL-CP-NCs 发挥缓释作用、保护作用及促吸收作用等。

2.12 ISL-CP-NCs 释药行为及释药机制研究

取异甘草素和 ISL-CP-NCs 粉末适量,使异甘草素含量均为 10 mg,分别置于透析袋中(截留相

表 9 pH 值对 ISL-CP-NCs 粒径、PDI 和 ζ 电位的影响
($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 9 Effects of pH value on particle size, PDI value, and ζ potential of ISL-CP-NCs ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

pH 值	粒径/nm	PDI 值	ζ 电位/mV
2.0	375.77 $\pm$ 69.25	0.483 $\pm$ 0.052	-15.12 $\pm$ 0.88
3.5	369.68 $\pm$ 56.18	0.356 $\pm$ 0.044	-15.96 $\pm$ 0.62
5.0	331.23 $\pm$ 48.66	0.361 $\pm$ 0.037	-16.15 $\pm$ 0.46
5.5	325.81 $\pm$ 40.27	0.282 $\pm$ 0.029	-16.64 $\pm$ 0.93
6.8	288.49 $\pm$ 38.74	0.264 $\pm$ 0.031	-18.62 $\pm$ 0.87
7.4	263.94 $\pm$ 33.10	0.226 $\pm$ 0.033	-19.17 $\pm$ 1.16

对分子质量 8 000~14 000),加入 5 mL 模拟胃液 (pH 2.0,含胃蛋白酶和 1.5% SDS),震荡使之混匀。采用 1 000 mL、37 °C 的模拟胃液作为介质,转速为 75 r/min,于 0.25、0.5、1、1.5、2、3、4、6、8、10、12 h 取样 3 mL,分别补加 5 mL 模拟胃液,样品加入 1 mol/L NaOH 溶液 25 μ L,加乙腈定容至 5 mL,8 500 r/min 离心(离心半径 6.8 cm)10 min,取上清液测定异甘草素含量。同法考察异甘草素和 ISL-CP-NCs 粉末在模拟肠液 (pH 7.4,含胰蛋白酶和 1.5% SDS) 中的释药行为,各样品加入 1 mol/L HCl 溶液 25 μ L,乙腈定容至 5 mL,8 000 $\times$ g 离心 10 min,取上清液测定异甘草素含量。结果见图 10,异甘草素原料药在模拟胃液、模拟肠液中累积释放度分别为 39.84%和 45.66%, ISL-CP-NCs 在模拟胃液、模拟肠液中累积释放度分别提高至 83.83%和 78.87%,说明 ISL-CP-NCs 使异甘草素累积释放度得到明显提高。ISL-CP-NCs 在模拟胃液、模拟肠液中释药行为存在一定差别,可能与异甘草素在胃肠液中稳定性有关^[24]。ISL-CP-NCs 释药模型拟合结果见表 10, ISL-CP-NCs 在模拟胃液、模拟肠液中的释药行为均符合 Weibull 模型,相关系数 R^2 分别

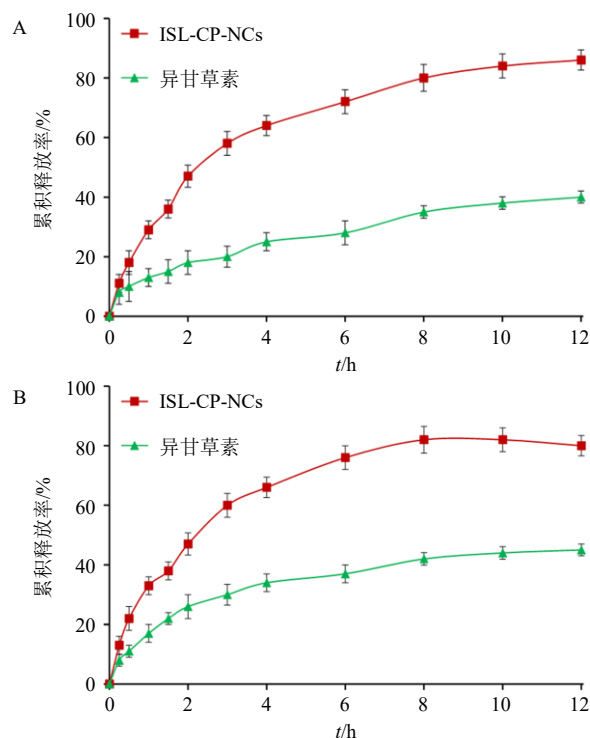


图 10 异甘草素和 ISL-CP-NCs 在模拟胃液 (A) 和模拟肠液 (B) 体外释放曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 10 *In vitro* release profiles of isoliquiritigenin and ISL-CP-NCs in simulate gastric juices (A) and simulate intestinal juices (B) ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

表 10 ISL-CP-NCs 释放模型及其拟合方程

Table 10 Release model and fitting equation of ISL-CP-NCs

模型	模拟胃液	模拟肠液
一级释放	$\ln(1-M_t/M_\infty)=-0.039\ 0\ t-0.519\ 4$, $R^2=0.749\ 7$	$\ln(1-M_t/M_\infty)=-0.031\ 0\ t-0.623\ 4$, $R^2=0.558\ 0$
Higuchi	$M_t/M_\infty=0.126\ 5\ t^{1/2}+0.173\ 6$, $R^2=0.849\ 7$	$M_t/M_\infty=0.117\ 3\ t^{1/2}+0.208\ 0$, $R^2=0.774\ 3$
Weibull	$\ln\ln[1/(1-M_t/M_\infty)]=0.698\ 8\ \ln t-1.001\ 3$, $R^2=0.993\ 4$	$\ln\ln[1/(1-M_t/M_\infty)]=0.612\ 7\ \ln t-0.851\ 8$, $R^2=0.961\ 2$

为 0.993 4 和 0.961 2。

2.13 ISL-CP-NCs 粉末稳定性考察

取新制备 ISL-CP-NCs 混悬液, 测定异甘草素含量 (m_0), 并采用该批次 ISL-CP-NCs 混悬液制备成粉末, 密封于自封袋, 置于温度 40 °C、湿度 75% 的恒温恒湿箱中 (加速稳定性条件), 分别于 0、1、2、3、6 月取样, 加入纯化水分散, 经 0.45 μm 微孔滤膜除去析出的药物, 测定续滤液中异甘草素的量 (m_i), 计算沉降率, 并测定复溶后的包封率、粒径和 ζ 电位。结果见表 11, 加速第 6 个月 ISL-CP-NCs 粉末沉降率小于 2.0%; 包封率有所下降, 但仍大于 80%; 粒径有所增大, 但远小于 150 nm; ζ 电位绝对值在 20 mV 左右波动, 未发生明显变化, 表明 ISL-CP-NCs 粉末在密封条件下稳定性良好。

$$\text{沉降率}=(m_0-m_i)/m_0$$

表 11 ISL-CP-NCs 稳定性考察结果 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)Table 11 Stability results of ISL-CP-NCs ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

t/月	沉降率/%	包封率/%	粒径/nm	ζ 电位/mV
0	0.52 $\pm$ 0.03	84.76 $\pm$ 1.02	94.79 $\pm$ 5.41	-20.02 $\pm$ 1.03
1	1.16 $\pm$ 0.14	84.38 $\pm$ 0.91	92.80 $\pm$ 7.02	-19.84 $\pm$ 0.88
2	1.58 $\pm$ 0.05	84.59 $\pm$ 1.17	95.24 $\pm$ 4.58	-20.15 $\pm$ 0.90
3	1.70 $\pm$ 0.08	84.06 $\pm$ 0.84	103.56 $\pm$ 6.16	-19.67 $\pm$ 1.52
6	1.88 $\pm$ 0.11	83.75 $\pm$ 0.92	114.03 $\pm$ 5.87	-19.71 $\pm$ 1.14

2.14 口服药动力学行为考察

2.14.1 给药及取血方案 使用 0.5% CMC-Na 水溶液配制各个样品的灌胃混悬液, 以异甘草素含量计质量浓度均为 8 mg/mL。取 18 只 SD 大鼠随机分为异甘草素组、物理混合物组 (药物与辅料比例同 ISL-CP-NCs 粉末) 和 ISL-CP-NCs 组, 分别按异甘草素 50 mg/kg 进行 ig 给药, 立即计时。异甘草素和物理混合物组于 0.25、0.50、1.00、1.50、2.00、3.00、4.00、6.00、8.00、10.00、12.00 h 乙醚麻醉, 并于眼眶后静脉丛取血。预实验发现 ISL-CP-NCs 药动学行为发生较大变化, 故将取血时间调整为 0.50、1.00、1.50、2.00、3.00、4.00、5.00、6.00、8.00、10.00、12.00 h, 同法麻醉并取血。取血量约 250 μL , 抗凝处理后 4 °C 温度下 1 000 $\times$ g 离心 4 min, 将血

浆冷冻保存, 测定时置 37 °C 水浴中解冻。

2.14.2 内标溶液配制及血浆样品预处理 精密称取乙酰苯胺对照品, 采用乙腈稀释配制质量浓度为 800 ng/mL, 密封, 保存在 8 °C 冰箱中, 作为内标溶液。精密量取 100 μL 乙酰苯胺内标溶液和 100 μL 血浆样品至离心管中, 密封后涡旋 20 s, 加入 1.5 mL 甲醇, 密封后涡旋 2 min。4 °C 温度下 8 000 $\times$ g 离心 15 min, 取上层有机相至空白离心管中, 置于氮吹仪中在 40 °C 温度下氮气吹干, 加入乙腈 100 μL , 密封后涡旋 2 min 复溶残渣, 再次 8 000 $\times$ g 离心 15 min, 即得含乙酰苯胺内标的血浆样品溶液。

2.14.3 线性回归曲线 取健康 SD 大鼠, 注射 3% 戊巴比妥钠溶液麻醉, 立即心脏取血, 抗凝处理后 4 °C 温度下 1 000 $\times$ g 离心 4 min, 即得空白血浆。采用空白血浆配制质量浓度为 2 000.00、1 000.00、500.00、250.00、100.00、33.33 ng/mL 异甘草素血浆对照品溶液, 分别精密取 100 μL , 按照“2.14.2”项下方法处理, 按照“2.3.1”项下色谱条件测定异甘草素与乙酰苯胺峰面积, 并计算两者峰面积比值 (Y), 并与异甘草素质量浓度 (X) 进行线性回归, 得回归方程 $Y=1.724\ 6\ X-0.328\ 2$, $r=0.998\ 9$, 结果表明异甘草素在 33.33~2 000.00 ng/mL 线性关系良好。

2.14.4 专属性考察 取空白血浆溶液、异甘草素血浆对照品溶液 (质量浓度为 33.33 ng/mL) 和血浆样品溶液 (异甘草素 ig 12 h), 按照“2.3.1”项下色谱条件进样测定。结果见图 11, 乙酰苯胺和异甘草素分离度良好, 色谱峰专属性良好。

2.14.5 精密度考察 吸取质量浓度分别为 33.33、1 000.00、2 000.00 ng/mL 异甘草素血浆对照品溶液, 按照“2.3.1”项下色谱条件连续测定 6 次, 计算得异甘草素和乙酰苯胺峰面积比的 RSD 分别为 7.12%、3.65%、4.03%; 将 3 个质量浓度异甘草素血浆对照品溶液每天测试 1 次, 连续测试 6 d, 异甘草素和乙酰苯胺峰面积比的 RSD 分别为 6.65%、5.10%、4.29%, 结果表明日内、日间精密度良好。

2.14.6 稳定性考察 取 ISL-CP-NCs ig 4 h 血浆样

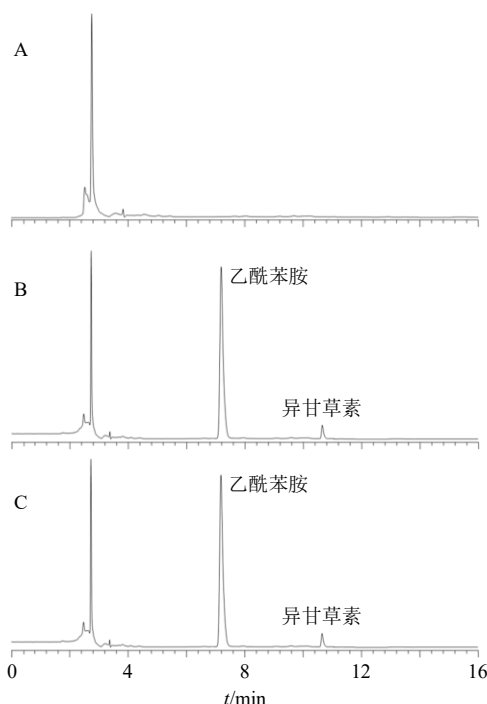


图 11 空白血浆 (A)、血浆对照品 (B) 和血浆样品溶液 (C) 的 HPLC 图

Fig. 11 HPLC of blank plasma (A), plasma reference substance (B) and plasma sample solution (C)

品溶液置于室温（温度和湿度分别为 25℃和 60%），分别于 0、3、6、12、18、24 h，按照“2.3.1”项下色谱条件进样测定，异甘草素和乙酰苯胺峰面积比的 RSD 为 5.83%，结果表明血浆样品溶液稳定性良好。

2.14.7 重复性考察 配制质量浓度为 250.00 ng/mL 异甘草素血浆样品，按照“2.14.2”项下方法制备 6 份供试品溶液（含乙酰苯胺内标），分别按照“2.3.1”项下色谱条件测定异甘草素和乙酰苯胺峰面积，异甘草素质量浓度的 RSD 为 3.74%，结果表明该实验重复性良好。

2.14.8 加样回收率考察 吸取 33.33 ng/mL（低质量浓度）、1 000.00 ng/mL（中质量浓度）和 2 000.00

ng/mL（高质量浓度）异甘草素对照品溶液，分别精密吸取 100 μL，按照“2.14.2”项下方法制备血浆对照品溶液（含乙酰苯胺内标），测定并计算异甘草素测得质量浓度，以实际质量浓度为参考计算回收率。结果显示，低、中、高质量浓度加样回收率分别为 96.97%、101.26%、98.43%，RSD 分别为 3.61%、5.33%、4.19%，结果表明该实验准确度良好。

2.14.9 药动力学结果 根据异甘草素、物理混合物和 ISL-CP-NCs 取样时间及对应的血药浓度，绘制药-时曲线，结果见图 12。采用 DAS 2.0 软件非房室模型分别计算各组主要药动力学参数，结果见表 12。与异甘草素原料药相比，物理混合物 C_{max} 、 AUC_{0-t} 和 $AUC_{0-\infty}$ 有显著性提高 ($P < 0.05$)，相对口服吸收生物利用度提高至 1.39 倍，表明玉米肽在一定程度上促进了异甘草素的体内吸收，可能与玉米肽自身具有表面活性剂作用有关^[15-16]。ISL-CP-NCs 的 t_{max} 延后至 (2.17 ± 0.56) h， $t_{1/2}$ 延长至 (4.23 ± 1.61) h，而 C_{max} 、 AUC_{0-t} 和 $AUC_{0-\infty}$ 均具有极显著性提高 ($P < 0.01$)，表明 ISL-CP-NCs 极大改变了异甘草素体内

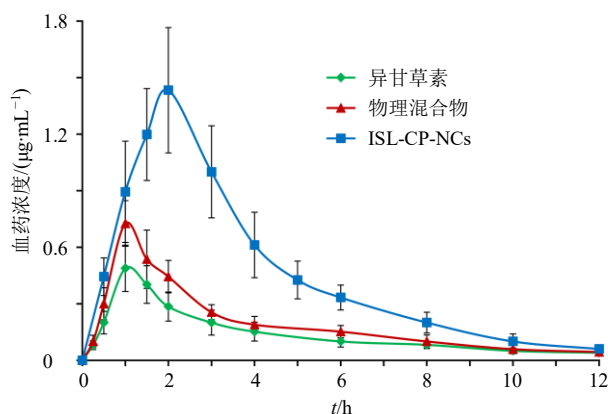


图 12 异甘草素、物理混合物和 ISL-CP-NCs 药-时曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 12 Profiles of plasma concentration-time of isoliquiritigenin, physical mixture and ISL-CP-NCs ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

表 12 异甘草素、物理混合物和 ISL-CP-NCs 药动力学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 12 Pharmacokinetic parameters of isoliquiritigenin, physical mixture and ISL-CP-NCs ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

参数	单位	异甘草素原料药	物理混合物	ISL-CP-NCs
t_{max}	h	0.96 ± 0.24	1.03 ± 0.28	$2.17 \pm 0.56^{*#}$
$t_{1/2}$	h	2.69 ± 1.35	2.87 ± 0.91	$4.23 \pm 1.61^{*#}$
C_{max}	ng·mL ⁻¹	488.09 ± 103.77	$608.56 \pm 124.60^{*}$	$1\ 661.87 \pm 200.18^{***}$
AUC_{0-t}	ng·mL ⁻¹ ·h	$3\ 371.61 \pm 575.34$	$4\ 612.49 \pm 607.03^{*}$	$13\ 080.91 \pm 2\ 463.92^{***}$
$AUC_{0-\infty}$	ng·mL ⁻¹ ·h	$3\ 424.13 \pm 603.28$	$4\ 775.37 \pm 669.37^{*}$	$13\ 994.83 \pm 2\ 553.14^{***}$

与异甘草素比较: $^{*}P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$; 与物理混合物比较: $^{#}P < 0.05$ $^{##}P < 0.01$ 。

$^{*}P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$ vs isoliquiritigenin; $^{#}P < 0.05$ $^{##}P < 0.01$ vs physical mixture.

药动学行为,有效促进了口服吸收^[25], ISL-CP-NCs 的 $C_{\max}$ 和相对口服吸收生物利用度分别提高至 3.40 倍和 3.88 倍。与物理混合物相比, ISL-CP-NCs 的 $t_{\max}$ 、 $t_{1/2}$ 、 $C_{\max}$ 、 $AUC_{0\sim t}$ 和 $AUC_{0\sim\infty}$ 仍有显著性差异 ($P<0.05$ 、 0.01), 证明 ISL-CP-NCs 对异甘草素药动学行为影响更大, 且促吸收作用更明显。

2.15 统计学分析

数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 24.0 软件单因素方差分析 (one-way ANOVA) 进行组间比较, $P<0.05$ 判定组间存在显著差异。

3 讨论

目前, 测定纳米制剂常用方法有高速离心法、超滤法等, 但较高的离心力容易破坏纳米结构, 而且对于粒径极小的纳米粒难以完全有效分离, 进而可能影响测得结果的准确性。本研究采用乙酸乙酯提取法测定 ISL-CP-NCs 包封率, 将 ISL-CP-NCs 混悬液经 $0.45\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过除去未形成 ISL-CP-NCs 的异甘草素, 由于异甘草素在水中溶解度极差, 故滤液中异甘草素的量可认为是参与形成 ISL-CP-NCs 的药量。由于异甘草素易溶于醋酸乙酯, 而玉米肽极难溶于醋酸乙酯, 故利用两者溶解度差异而实现异甘草素提取及分离, 且操作相对简单, 可为相关研究提供参考^[26]。

ISL-CP-NCs 中玉米肽用量远高于异甘草素, 且玉米肽粉末黏度稳定, 流动性良好, 故在制备 ISL-CP-NCs 冻干粉末时无需再添加冻干保护剂, 减少了制剂中辅料种类^[13]。ISL-CP-NCs 冻干粉末继承了玉米肽自组装特性, 复溶后仍呈纳米混悬状态。溶解度考察结果显示, 异甘草素与玉米肽的物理混合物可显著提高异甘草素的溶解度, 这是由于玉米肽是一种两亲性表面活性剂^[26], 对异甘草素产生了增溶作用, 但物理混合物增溶幅度远低于 ISL-CP-NCs 粉末, 主要与 ISL-CP-NCs 进一步降低了药物粒径、改变药物晶型 (异甘草素转变为无定形态) 等原因有关^[23]。异甘草素原料药体外溶出度极低, 会极大影响药物体内吸收, ISL-CP-NCs 极大提高了异甘草素在模拟胃、肠液中累积释放度, 有助于解决异甘草素口服吸收瓶颈。ISL-CP-NCs 在模拟肠液中后期出现累积释放度下降情况, 这可能与释放出去的异甘草素在模拟肠液中发生一定程度的降解有关。

药动学结果显示, 物理混合物药动学参数有显著性改变 ($P<0.05$), 相对口服吸收生物利用度提

高至 1.39 倍, 表明玉米肽对异甘草素体内吸收产生了较大的促进作用, 可能是玉米肽可抑制胃肠道内胃蛋白酶及胰蛋白酶活性^[27], 利于提高药物生物利用率; 玉米肽通过发挥两亲性表面活性剂作用增加了异甘草素在胃肠道液中的溶解度, 利于提高异甘草素体内吸收。

ISL-CP-NCs 的 $t_{\max}$ 发生显著性延后 ($P<0.05$), 可能是由于 ISL-CP-NCs 粒径较小, 易滞留于肠道褶皱中, 影响了释药速率及吸收速率^[28]; ISL-CP-NCs 本身具有缓释特征, 延长了药物进入体循环时间, 从而使异甘草素 $t_{\max}$ 发生较大变化^[13]。异甘草素在肠道中易降解, 而 ISL-CP-NCs 对内部的药物可起到较好的保护作用^[26,28], 降低了降解几率, 利于增加后期吸收量, 且 ISL-CP-NCs 的 $t_{\max}$ 发生显著性延后, 最终使 ISL-CP-NCs 的 $t_{1/2}$ 发生显著性延长 ($P<0.05$), 利于使药物成分吸收。ISL-CP-NCs 的 $C_{\max}$ 和相对口服吸收生物利用度分别提高至 3.40 倍和 3.88 倍, 可能是 ISL-CP-NCs 提高了异甘草素溶解度及累积溶出度, 解决了体内吸收瓶颈; 纳米级别的 ISL-CP-NCs 导致药物比表面积激增, 与胃肠道黏膜接触几率极大增加, 利于 ISL-CP-NCs 经胞间转运、淋巴转运等途径进入血液循环, 提高了吸收效率; 异甘草素在 ISL-CP-NCs 中以无定形态存在, 而无定形态药物比晶态药物更易吸收^[12-13,29]; 玉米肽在一定程度上可增加异甘草素体内吸收, 因而在多种因素共同作用下使异甘草素生物利用度得到显著改善。高青等^[7]制备了异甘草素聚乳酸纳米粒, 48 h 累积释放度仅 76.63%, 相对生物利用度仅提高至 1.70 倍; 刘勇华等^[11]采用表面活性剂 (十二烷基硫酸钠) 制备了异甘草素纳米混悬剂, 在 60 min 内释药基本完毕, 过快的释药速率容易导致血药浓度波动较大, 相对生物利用度提高至 3.04 倍。本研究制备了 ISL-CP-NCs, 处方中未使用化学合成的表面活性剂或辅料, 12 h 累积释放度约 80%, 释药速率适中, 且相对生物利用度提高幅度更具优势 (3.88 倍), 因而推广意义更大。

综上, 本研究使用天然来源、价格低廉、安全性高的玉米肽作为配体成功制备了 ISL-CP-NCs, 处方中未使用合成类药用辅料, 极大提高了临床使用安全性。ISL-CP-NCs 极大提高了异甘草素溶解度及溶出度, 解决了异甘草素口服吸收瓶颈, 生物利用度得到显著改善, 且 ISL-CP-NCs 粉末储存稳定性良好, 为评价 ISL-CP-NCs 成药性提供了参考依据,

也为后续研究奠定了实验基础。但玉米肽具有一定的苦味,会影响临床使用的顺应性,需对玉米肽制备工艺进行深入研究,以降低苦味对制剂口感的影响,也可在处方中添加甜味剂或掩味剂来进行矫正,这也是后续研究工作重心。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 吴新, 吴涛, 王冰清, 等. 不同产地甘草 UPLC 指纹图谱的建立及 6 种成分定量分析 [J]. 中草药, 2025, 56(7): 2518-2526.
- [2] 魏海霞, 孔伟, 巩萍. 异甘草素的药效学研究进展 [J]. 药物生物技术, 2019, 26(5): 467-470.
- [3] 赵孟楠, 龚苏晓, 魏雨清, 等. 不同证型外感咳嗽治疗中药处方用药规律分析 [J]. 药物评价研究, 2024, 47(9): 2147-2156.
- [4] 徐卓, 陈颖翀, 林龙飞, 等. 异甘草素抗肿瘤新型给药系统的研究进展 [J]. 中草药, 2023, 54(17): 5806-5815.
- [5] 韩嘉骏, 郭寅龙. 黄酮类化合物油水分配系数的实验测定值和软件估算值的比较研究 [J]. 化学世界, 2019, 60(9): 611-617.
- [6] Liu F, Sun L L, You G J, *et al.* Effects of *Astragalus* polysaccharide on the solubility and stability of 15 flavonoids [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 143: 873-880.
- [7] 高青, 马记平. 异甘草素聚乳酸纳米粒的制备及在大鼠体内药动学 [J]. 医药导报, 2020, 39(1): 85-89.
- [8] Lee Y K, Chin Y W, Bae J K, *et al.* Pharmacokinetics of isoliquiritigenin and its metabolites in rats: Low bioavailability is primarily due to the hepatic and intestinal metabolism [J]. *Planta Med*, 2013, 79(17): 1656-1665.
- [9] Song W T, Bai L, Xu P X, *et al.* Long-circulating and brain-targeted liposomes loaded with isoliquiritigenin: Formation, characterization, pharmacokinetics, and distribution [J]. *Pharmaceutics*, 2024, 16(8): 975.
- [10] Wang J M, Chen H J, Guo T, *et al.* Isoliquiritigenin nanoemulsion preparation by combined sonication and phase-inversion composition method: *In vitro* anticancer activities [J]. *Bioengineering*, 2022, 9(8): 382.
- [11] 刘勇华, 张留超, 郭晓娜. 异甘草素纳米混悬剂的制备及其体内药动学研究 [J]. 中成药, 2022, 44(5): 1379-1385.
- [12] 周静宇, 张邵, 程艺, 等. 表面活性剂在纳米制剂中的研究进展 [J]. 医药导报, 2024, 43(11): 1790-1798.
- [13] 王彦阁, 陈晨, 丁林, 等. 以甜菊糖苷为载体的二氢杨梅素纳米胶束的制备、表征及口服生物利用度评价 [J]. 中草药, 2024, 55(23): 8011-8022.
- [14] 李啸鹏, 姚静, 施钧瀚, 等. 中成药安慰剂辅料、制备与评价的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2024, 47(3): 632-641.
- [15] 朱晔. 玉米肽制剂的解酒保肝作用研究 [D]. 开封: 河南大学, 2019.
- [16] 闫昌誉, 李怡芳, 李晓敏, 等. 玉米肽的研究与应用进展 [J]. 今日药学, 2021, 31(5): 321-333.
- [17] 吴晗硕, 任杰, 付少委, 等. 玉米肽钙螯合物的结构表征和螯合机制 [J]. 中国食品学报, 2024, 24(10): 115-123.
- [18] Afonso I, Neves A R, Eusébio D, *et al.* Design of experiments to tailor the potential of BSA-coated peptide nano complexes for temozolomide/p53 gene co-delivery [J]. *Pharmaceutics*, 2024, 16(11): 1389.
- [19] 姚甜, 文旭娜, 刘帅华, 等. 卤代黄酮类化合物与人血清白蛋白的相互作用 [J]. 化学研究与应用, 2025, 37(2): 353-365.
- [20] 彭鹏, 白丽. 基于网络药理学和分子对接探讨美洲大蠊 CII-3 治疗结直肠癌的作用机制 [J]. 现代药物与临床, 2025, 40(2): 319-329.
- [21] Cao Y J, Song Z Y, Xin K Q, *et al.* Novel biopolymer-based active packaging material for chilled beef applications: Collagen peptide-astragaloside nano complexes incorporated into oxidized hydroxypropyl starch/chitosan films [J]. *Int J Biol Macromol*, 2025, 297: 139854.
- [22] 朱振鑫. 超声波辅助双水相萃取甘草中的光甘草定和异甘草素及对 MRSA 的抗菌作用研究 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2023.
- [23] 曹伶俐, 刘素梅. 甜菊糖苷-高良姜素纳米复合物的制备及其理化性质评价 [J]. 化学研究与应用, 2025, 37(6): 1506-1514.
- [24] 郭玉岩, 高滔, 李春城, 等. 酸碱药对甘草-马钱子配伍汤液沉积相态释放特性研究 [J]. 中草药, 2022, 53(10): 3000-3005.
- [25] 郭亚利, 董晓函, 李阳杰. 基于“药辅合一”的茶皂素-金合欢素纳米混悬剂制备及其药动学与调血脂作用研究 [J]. 药物评价研究, 2025, 48(8): 2233-2246.
- [26] Feng Z R, Shao B, Yang Q L, *et al.* The force of Zein self-assembled nanoparticles and the application of functional materials in food preservation [J]. *Food Chem*, 2025, 463(Pt 1): 141197.
- [27] 熊婷. 超声辅助玉米肽钙微胶囊的制备、结构和功能性研究 [D]. 镇江: 江苏大学, 2022.
- [28] 孙丽, 李瑞华, 吉媛媛, 等. 高良姜素自胶束化固体分散体的制备、口服药动学和降血糖作用评价 [J]. 药物评价研究, 2025, 48(1): 143-156.
- [29] 刘万路. 柚皮素磷脂酰胆碱复合物滴丸处方优化及口服药动学评价 [J]. 中草药, 2023, 54(19): 6253-6263.

[责任编辑 郑礼胜]