

DOI: 10.11830/ISSN.1000-5013.201903039



反式白藜芦醇纳米粒的制备 及其体外评价

吴思晓¹, 周玥莹¹, 于慧敏², 王立强¹

(1. 华侨大学 生物医学学院, 福建 泉州 362021;

2. 哈尔滨医科大学 附属第二医院, 黑龙江 哈尔滨 150080)

摘要: 采用离子交联法制备反式白藜芦醇纳米粒(t-Res-NPs),通过 Box-Behnken 效应面法优化制备工艺.从包封率、粒径、Zeta 电位、载药量、纳米粒形态、缓释作用、稳定性等方面对 t-Res-NPs 进行体外评价.结果表明:t-Res-NPs 粒径为 (85.38 ± 1.69) nm,Zeta 电位为 (19.93 ± 3.25) mV,包封率为 $(88.31 \pm 0.59)\%$,载药量为 $(5.96 \pm 1.60)\%$;纳米粒形态呈圆形;t-Res-NPs 具有良好的缓释作用,释放过程较为平稳,突释现象不明显;肠内菌对 t-Res-NPs 及反式白藜芦醇(t-Res)几乎无代谢作用,肝脏代谢酶对 t-Res 具有强烈的代谢作用,而 t-Res-NPs 可以有效地保护药物,减慢其代谢速率;t-Res-NPs 可明显改善 t-Res 溶解度差、生物利用度低的缺点.

关键词: 白藜芦醇; 纳米粒; Box-Behnken 效应面法; 工艺优化; 体外评价

中图分类号: R 285; R 931

文献标志码: A

文章编号: 1000-5013(2019)06-0771-08

Preparation and *In Vitro* Evaluation of Trans-Resveratrol Nanoparticles

WU Sixiao¹, ZHOU Yueying¹, YU Huimin², WANG Liqiang¹

(1. School of Biomedical Sciences, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China;

2. Second Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Harbin 150080, China)

Abstract: Trans-resveratrol nanoparticles (t-Res-NPs) were prepared by ion-crosslinking, and the preparation process was optimized by Box-Behnken effect surface method. t-Res-NPs were evaluated *in vitro* from the aspects of encapsulation efficiency, particle size, Zeta potential, drug loading, nanoparticle morphology, sustained release and stability. The results show that the prepared t-Res-NPs have particle size of (85.38 ± 1.69) nm, Zeta potential of (19.93 ± 3.25) mV, entrapment efficiency of $(88.31 \pm 0.59)\%$, and the drug loading of $(5.96 \pm 1.60)\%$; the nanoparticle morphology is round; t-Res-NPs have a good sustained release effect, and the release process is relatively stable, which has no obvious burst release phenomenon; intestinal bacteria have almost no metabolism to t-Res-NPs and trans-resveratrol (t-Res), while liver metabolic enzymes have a strong metabolic effect on t-Res, and t-Res-NPs can protect the drug effectively and slow down its metabolic rate; t-Res-NPs can improve the poor solubility and low bioavailability of t-Res significantly.

Keywords: resveratrol; nanoparticles; Box-Behnken effect surface method; process optimization; *in vitro* evaluation

收稿日期: 2019-03-18

通信作者: 王立强(1970-),男,教授,博士,主要从事药剂学和创新药物的研究. E-mail: wlq1599@163.com.

基金项目: 国家重点研发计划项目(2016YFE0101700);福建省高校产学研合作项目(2019Y4007)

反式白藜芦醇(t-Res)是一种天然的非黄酮类多酚化合物,存在于葡萄、虎杖、花生等多种植物中,是一种植物抗毒素. 迄今为止的研究表明,t-Res 具有抗肿瘤^[1-3]、保护心血管系统^[4-6]、抗氧化^[7]等多种药理作用,具有很大的药用价值和市场前景. 然而,在实际运用中,t-Res 存在以下 3 个主要缺点:1) 在水溶液中溶解度低,t-Res 在体内的溶出速率受限^[8];2) t-Res 经口服进入胃肠道时,在代谢酶作用下发生葡萄糖醛酸化和硫酸化等Ⅱ相代谢反应,从而失去药理活性^[9];3) t-Res 半衰期短,代谢迅速,量效不相关,导致其无法在体内停留足够的时间并充分发挥药效^[10-11]. 以上问题导致国内外已上市的以 t-Res 为有效成分的保健食品的单位剂量较高,其在体内的生物利用度极低,且以 t-Res 作为药物开发的制剂,经口服给药途径进入体循环的药物质量浓度远低于其发挥生物学作用的有效质量浓度,导致临床无效. 因此,如何增加 t-Res 的溶解度,提高其口服生物利用度,并在体内维持较高水平的稳态血药质量浓度成了亟待解决的问题. 本文运用纳米载体技术,以生物可降解材料壳聚糖为药物载体,将 t-Res 制成反式白藜芦醇纳米粒(t-Res-NPs),对 t-Res-NPs 的制备进行优化,并对其进行体外评价.

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与材料

1) 仪器:1200 型高效液相色谱仪(图像二极管阵列(DAD)检测器,美国安捷伦公司);紫外可见分光光度计(日本岛津公司);BSA124S 型电子天平(德国赛多利斯科学仪器有限公司);HHS11-2S 型恒温水浴锅(上海跃进医疗器械厂);磁力加热搅拌器(江苏省金坛市友联仪器研究所);NanoBrook Omni 型多角度纳米粒度与高灵敏度 Zeta 电位分析仪(美国布鲁克海文仪器公司);JEM-1200EX 型透射电子显微镜(日本电子株式会社);5430R 型台式高速冷冻离心机(德国艾本德公司);RC-806D 型溶出试验仪(天津市天大天发科技有限公司);OM220 型智能鼓风干燥箱(上海欧迈科学仪器有限公司);KQ-500E 型超声仪(江苏省昆山市超声仪器有限公司);JR92-IIDN 型超声波细胞破碎仪(浙江省宁波市新芝生物科技股份有限公司);LRH 系列生化培养箱(上海一恒科学仪器有限公司),Infinite M200 型多功能酶标仪(瑞士帝肯公司);厌氧培养袋、氧气发生剂(日本三菱瓦斯化学株式会社).

2) 试剂与材料:反式白藜芦醇(纯度>98.5%),甲醇、乙腈(色谱纯),其余的试剂均为市售分析纯;SD 雌性大鼠,6 只,普通级,体质量为 200~250 g,购于福建省闽侯县吴氏实验动物贸易有限公司.

1.2 t-Res-NPs 的制备

采用离子交联法制备 t-Res-NPs. 称取 20 mg 壳聚糖(CS),缓慢加入 20 mL 质量分数为 0.5%的醋酸溶液,室温下搅拌至溶解,用 2 mol·L⁻¹的 NaOH 溶液调节溶液 pH 值至 4.0,制得 1 mg·mL⁻¹的壳聚糖溶液;向壳聚糖溶液中加入 4 mg·mL⁻¹的 t-Res 的乙醇溶液和质量分数为 0.5%的吐温-80,另取 5 mg 三聚磷酸钠(TPP)溶于 10 mL 超纯水中,可得 0.5 mg·mL⁻¹的 TPP 溶液;将 TPP 溶液以 0.2 s⁻¹的滴速加入溶有 t-Res 的壳聚糖溶液中,交联搅拌一定时间,超声后,可得 t-Res-NPs 溶液.

1.3 Box-Behnken 效应面法优化

根据前期 t-Res-NPs 制备方法中的单因素爬坡实验结果,选取对 t-Res-NPs 粒径影响较为显著的 3 个因素 A~C,即 TPP 的质量浓度 ρ (TPP)、CS 的 pH 值、超声时间 t ,并在这 3 个水平上进行优化研究. 响应面因素水平表,如表 1 所示.

1.4 t-Res-NPs 的体外评价

1.4.1 包封率的测定 将 t-Res-NPs 溶液置于超滤离心管中,于 3 500 r·min⁻¹离心 30 min,所得滤液经 0.22 μ m 微孔滤膜过滤. 采用高效液相色谱仪测定其峰面积 S ,计算溶液中游离白藜芦醇的质量浓度. 包封率 η 的计算公式为 $\eta = \frac{\rho_0 - \rho_1}{\rho_0} \times 100\%$. 式中: ρ_1 为游离白藜芦醇的质量浓度; ρ_0 为未包封前白藜芦醇的质量浓度.

1.4.2 粒径与 Zeta 电位的测定 将 t-Res-NPs 溶液用超纯水溶解稀释至溶液澄清透明,通过多角度

表 1 效应面因素水平表
Tab. 1 Factors and levels of response surface method

水平	因素		
	A	B	C
	$\rho(\text{TPP})/\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	pH	t/s
-1	0.4	3.5	0
0	0.5	4.0	30
1	0.6	4.5	60

纳米粒度与高灵敏度 Zeta 电位分析仪直接测定 t-Res-NPs 的粒径和电位.

1.4.3 形态观察 将 t-Res-NPs 溶液用超纯水溶解稀释至溶液澄清透明, 超声 3 min 后滴在碳膜上, 静置 10 min 后用滤纸吸干, 自然晾干后, 采用透射电镜观察拍摄的纳米粒形态.

1.4.4 载药量的测定 将 t-Res-NPs 溶液置于培养皿中, 冷冻干燥 48 h 后, 可得絮状白色固体. 精确称取 5 mg 经冷冻干燥后得到的固体 t-Res-NPs, 用适量甲醇溶解, 置于 10 mL 容量瓶中, 甲醇定容至刻度, 超声破碎 15 min; 经 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 弃粗滤液, 取续滤液进行色谱分析. t-Res-NPs 载药量 Q 的计算公式为 $Q=\rho V/m$. 式中: ρ 为溶液中药物的质量浓度, 可根据标准曲线计算获得; m 为称取的纳米粒质量; V 为溶液体积.

1.4.5 不同释放介质中的释放度实验 采用透析法评价纳米粒在不同释放介质中的释放特性. 精确吸取 8 mL t-Res-NPs 溶液, 装入预处理好的透析袋(相对分子质量为 14 000)中, 分别将透析袋置于 400 mL 人工胃液^[12]、人工肠液^[12]和人工唾液^[13]中, 设定温度为 37 $^{\circ}\text{C}$, 搅拌速度为 100 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$. 分别在不同的时间点定时取出 2 mL 释放介质, 并即时补充等量空白释放介质. 采用高效液相色谱法测定 t-Res-NPs 的质量浓度, 计算 t-Res-NPs 的体外累计释放率并绘制累计释放曲线, 以等量的 t-Res 为对照组, 同法检测.

1.4.6 肠内菌代谢稳定性实验 取大鼠粪便适量, 按 1 g : 4 mL 的比例将粪便与厌氧培养液混合, 用玻璃棒研碎、搅拌均匀, 经纱布过滤后可得含大鼠肠内菌的培养液. 向装有 2.5 mL 含肠内菌培养液的培养皿中加入 500 μL 的 t-Res-NPs 溶液, 将培养皿置于厌氧培养袋中, 放入厌氧发生剂和氧气指示剂, 密封, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下恒温培养. 分别在不同的时间点取出培养袋, 于培养皿中取样 1 mL, 并向样品中加入 9 倍量的乙酸乙酯进行萃取, 涡旋, 于 10 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 下离心 10 min; 取上清液, 通过高效液相色谱法检测 t-Res-NPs 的质量浓度, 并以等量的 t-Res 为对照组, 同法检测.

1.4.7 肝匀浆代谢稳定性实验 取大鼠肝脏, 称量, 在冰浴下剪碎后, 加入 3 倍量的 Krebs-Henseleit 缓冲液, 用超声细胞破碎仪制成肝匀浆; 在 6 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 4 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下, 离心 20 min, 所得上清液即为大鼠肝匀浆液; 采用 BCA 蛋白试剂盒测定肝匀浆蛋白的质量浓度. 取 300 μL t-Res-NPs 溶液, 加入适量肝匀浆溶液(肝匀浆蛋白在孵育液中的 t-Res-NPs 终质量浓度为 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)和 pH 值为 7.4 的 Krebs-Henseleit 缓冲液, 反应终体积为 6 mL, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下恒温孵育. 分别在不同的时间点取样 0.5 mL, 并在样品中加入等量冰乙腈终止反应, 涡旋混匀后, 于 10 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 下离心 10 min; 取上清液, 用高效液相色谱法检测 t-Res-NPs 的质量浓度, 并以等量的 t-Res 为对照组, 同法检测.

2 实验结果与分析

2.1 Box-Behnken 效应面法设计结果

2.1.1 拟合方程 以 Y (粒径)为考察指标, 进行 17 次优化实验. Box-Behnken 实验设计及其响应值, 如表 2 所示.

表 2 Box-Behnken 实验设计及其响应值
Tab. 2 Box-Behnken experimental design and response value

实验号	A $\rho(\text{TPP})/\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	B pH	C t/s	Y d/nm	实验号	A $\rho(\text{TPP})/\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	B pH	C t/s	Y d/nm
1	0.5	3.5	60	113.09±3.23	10	0.6	3.5	30	156.18±3.29
2	0.6	4.5	30	150.91±2.87	11	0.4	4.0	60	108.91±1.77
3	0.5	4.0	30	99.46±1.77	12	0.5	4.5	60	102.63±9.00
4	0.4	3.5	30	132.64±6.27	13	0.5	4.0	30	90.91±2.92
5	0.5	4.0	30	83.34±1.53	14	0.6	4.0	60	135.93±2.12
6	0.4	4.0	0	136.50±4.51	15	0.6	4.0	0	166.14±4.09
7	0.5	3.5	0	150.70±1.71	16	0.5	4.5	0	142.86±6.06
8	0.5	4.0	30	101.97±0.87	17	0.5	4.0	30	99.70±4.92
9	0.4	4.5	30	145.36±2.05					

利用软件 Design-Expert 8.0 对表 2 的实验结果进行分析, 以粒径为因变量, 拟合方程为

$$Y = +1\,989.03 - 2\,563.80A - 625.08B - 1.06C - 89.94AB - 0.21AC - 0.038BC + 3\,037.28A^2 + 83.57B^2 + 0.012C^2, \quad P = 0.000\,6, \quad R^2 = 0.955\,9.$$

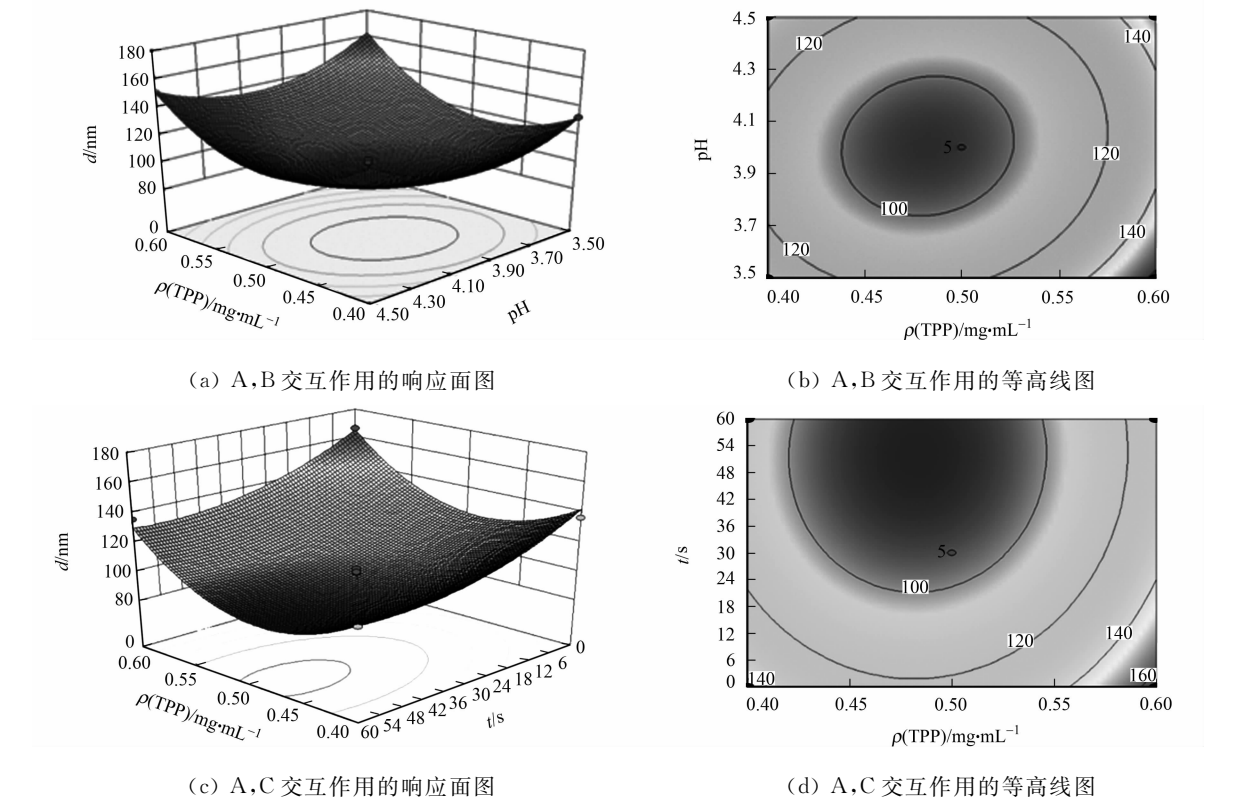
2.1.2 效应面优化与预测 由拟合方程的相关系数 $R^2=0.955\,9$ 可知:该方程对纳米粒粒径的拟合度良好,总模型方程具有统计学意义($P<0.05$);失拟项结果不显著,表明未知因素对实验结果干扰很小,提示实验结果可靠,可用来预测 t-Res-NPs 的粒径. 回归模型的方差分析,如表 3 所示. 表 3 中: F 为 F 检验的统计值.

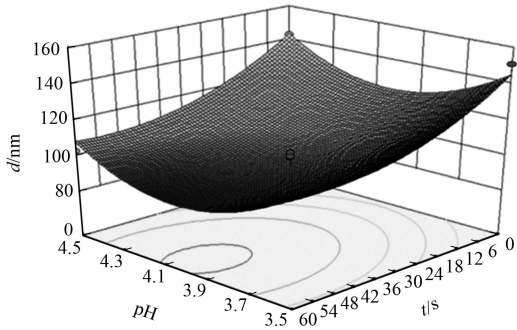
表 3 回归模型的方差分析
Tab. 3 Variance analysis of regression model

方差来源	总平方和	自由度	均方	F	P
模型	10 198.85	9	1 133.21	16.840	0.000 6
A	919.30	1	919.30	13.660	0.007 7
B	13.93	1	13.93	0.210	0.662 9
C	2 290.39	1	2 290.39	34.040	0.000 6
AB	80.89	1	80.89	1.200	0.309 2
AC	1.71	1	1.71	0.025	0.878 0
BC	1.37	1	1.37	0.020	0.890 7
A ²	3 884.26	1	3 884.26	57.720	0.000 1
B ²	1 837.99	1	1 837.99	27.310	0.001 2
C ²	5 56.18	1	556.18	8.270	0.023 8
残差	471.04	7	67.29	—	—
失拟项	224.80	3	74.93	1.220	0.411 8
纯误差	246.24	4	61.56	—	—
总离差	10 669.89	16	—	—	—

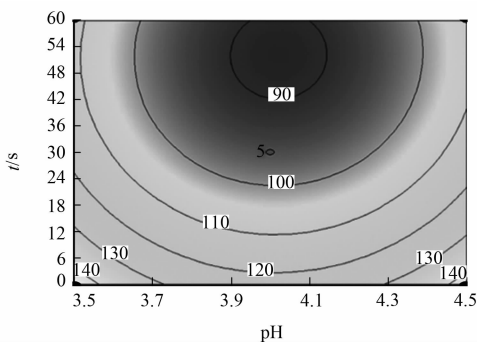
分别以 TPP 的质量浓度(A)、CS 的 pH 值(B)、超声时间(C)为响应因子,以粒径(Y)为响应值,绘制三维响应面图和等高线图,各因素间两两交互作用对粒径影响的效应面,如图 1 所示.

由图 1 可知:因素 A,B 交互作用的等高线图最圆,Y 随着二者的增大出现先减小后增大的趋势,与单因素考察实验结果较一致,说明 A,B 的交互作用对粒径的影响最小;相比之下,因素 B,C 与因素 A,





(e) B,C 交互作用的响应面图



(f) B,C 交互作用的等高线图

图 1 各因素间两两交互作用对粒径影响的效应面图

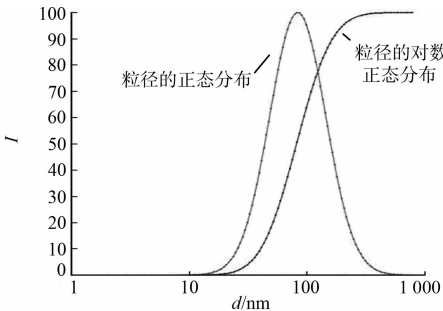
Fig. 1 Effect surface diagram of influence of interaction between two factors on particle size

C 交互作用对粒径的影响较大. 由图 1(c), (d) 可知: 随着 TPP 的质量浓度升高, Y 呈现先降低后升高的趋势, 当 TPP 达到适合质量浓度时, Y 具有最小值; 随着超声时间的不断增加, Y 呈现出一定的上升趋势. 因此, 在制备纳米粒的工艺中, 超声时间对 Y 有显著影响, 且对其他因素起到一定的作用.

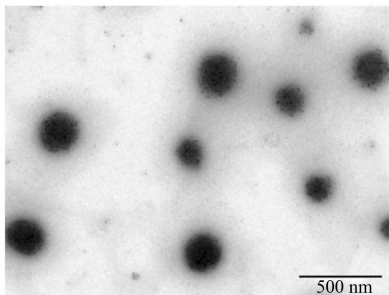
根据实验结果选定适当的评价范围, 可得到最优制备方法. 由软件预测可知: 当 TPP 的质量浓度为 $0.52 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, pH 值为 4.0, 超声时间为 48.09 s 时, 纳米粒的最小粒径为 85.13 nm.

2.2 优化工艺的验证

为了验证最优制备方法及模型的准确性, 考虑实际操作的可实施性, 将各处方因素进行微调, 即 TPP 的质量浓度为 $0.48 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, pH 值为 4.0, 超声时间为 52 s. 按照上述方法平行制备 3 组纳米粒, 并进行粒径、电位和形态等方面的测定, 可得纳米粒的粒径为 $(85.38 \pm 1.69) \text{ nm}$, 电位为 $(19.93 \pm 3.25) \text{ mV}$, 包封率为 $(88.31 \pm 0.59) \%$, 载药量为 $(5.96 \pm 1.60) \%$. 此时, 通过透射电镜观察显示纳米粒形态呈圆形, 粒径与激光粒度仪测得结果相符. t-Res-NPs 的粒径表征, 如图 2 所示. 图 2 中: I 为强度.



(a) 粒径分布图



(b) 透射电镜照片

图 2 t-Res-NPs 的粒径表征

Fig. 2 Particle size characterization of t-Res-NPs

2.3 不同释放介质中的释放度

以药物累计释放度(ϵ)为纵坐标, 释放时间(t_1)为横坐标, 绘制 t-Res-NPs 及 t-Res 在不同介质中的体外释放曲线, 如图 3 所示. 由图 3 可知: t-Res 在 3 种介质中释放迅速, 4 h 内的药物释放量均大于 80%; t-Res-NPs 的释放速度则明显慢于原料药, 前 8 h 药物释放相对较快, 3 种介质的累计释放率为 40% ~ 50%, 在 72 h 时释放完全. 因此, t-Res-NPs 具有良好的缓释作用, 释放过程较为平稳, 突释现象不明显.

2.4 肠内菌代谢的稳定性

根据 t-Res 的峰面积, 计算 t-Res 和 t-Res-NPs 在

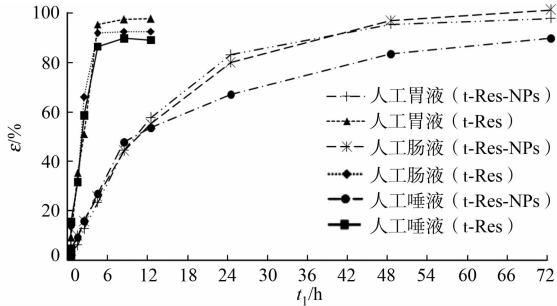


图 3 不同介质中 t-Res-NPs 和 t-Res 的体外释放曲线
Fig. 3 *In vitro* release profiles of t-Res-NPs and t-Res in different medias

肠内菌液中的不同时间点(t_2)的代谢剩余率 δ_1 ,如表 4 所示. 肠内菌实验相关的高效液相色谱图,如图 4 所示. 图 4 中: t' 为色谱柱流出物的流出时间. 由表 4,图 4 可知:t-Res,t-Res-NPs 在大鼠离体肠道菌群中几乎不代谢,可说明肠道菌群不参与 t-Res 的生物转化代谢.

表 4 t-Res-NPs 和 t-Res 在肠内菌液中的代谢剩余率

Tab. 4 Metabolic residual rate of t-Res-NPs and t-Res in intestinal bacteria

样品	t_2 /h							
	0	0.5	1	2	4	8	12	24
δ_1 (t-Res)/%	100.00	96.41	97.39	94.86	96.41	92.70	98.79	103.21
δ_1 (t-Res-NPs)/%	100.00	93.25	97.83	94.86	93.77	93.89	100.93	98.01

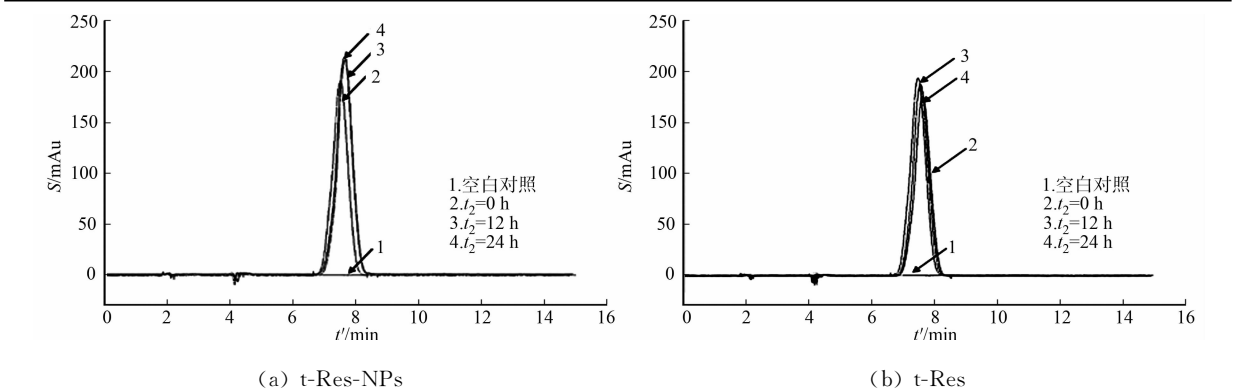


图 4 肠内菌实验相关的高效液相色谱图

Fig. 4 High performance liquid chromatography of intestinal bacteria test

2.5 肝匀浆代谢的稳定性

t-Res 和 t-Res-NPs 在肝匀浆中不同时间点(t_3)的代谢剩余率(δ_2),如表 5 所示. 肝匀浆实验相关的高效液相色谱图,如图 5 所示. 由表 5,图 5 可知:t-Res 在肝匀浆中温孵 360 min 后,其代谢剩余率为 2.22%,代谢作用强烈;而 t-Res-NPs 在肝匀浆中温孵 360 min 的代谢剩余率为 83.77%. 因此,将 t-Res 制成纳米粒剂型可以有效地保护药物,减慢其代谢速率.

表 5 t-Res-NPs 和 t-Res 在肝匀浆中的代谢剩余率

Tab. 5 Metabolic residual rate of t-Res-NPs and t-Res in liver homogenate

样品	t_3 /min							
	0	5	15	30	60	120	240	360
δ_2 (t-Res)/%	100.00	104.65	91.91	85.68	79.83	54.58	31.10	2.22
δ_2 (t-Res-NPs)/%	100.00	100.47	96.12	93.63	89.48	89.88	88.33	83.77

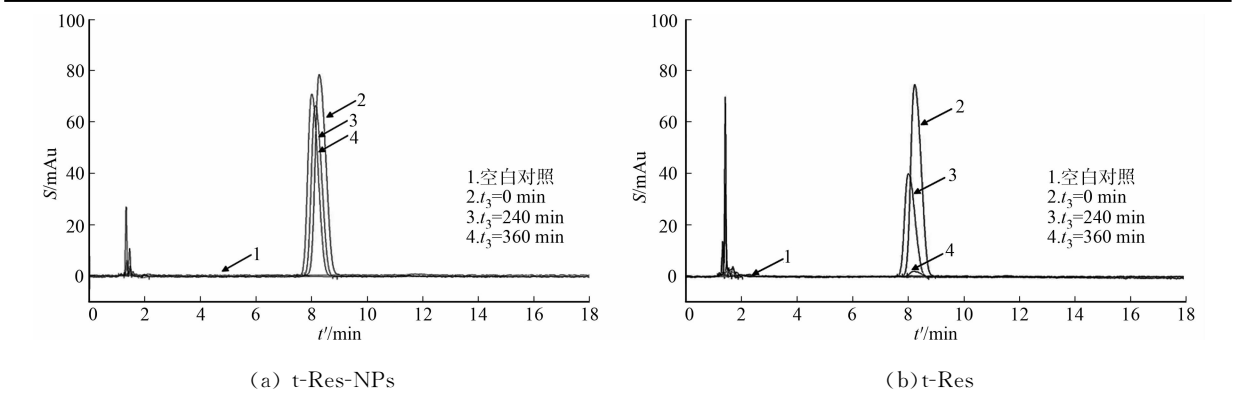


图 5 肝匀浆实验相关的高效液相色谱图

Fig. 5 High performance liquid chromatography of liver homogenate test

3 讨论

由于 t-Res 在水溶液中的溶解度极低,直接将其在人工胃液等释放介质中进行释放度实验不符合

漏槽条件.在预实验时,考察了多种表面活性剂对释放度实验的影响,结果显示以质量分数为 0.5% 的吐温-80 为表面活性剂时,粒子中的药物释放较为完全,故将其作为释放介质.

本产品预计在后期开发成为含服液,含服液在口腔中会有部分停留时间,释放出的药物会通过口腔粘膜直接吸收入血.因此,在释放介质的考察中添加了人工唾液,以考察药物在口腔中的溶出率,为类似剂型的体外考察提供新思路.

在实验中发现,t-Res-NPs 在人工胃液和人工肠液中释放得较为完全,而在人工唾液中累计释放量较低.在人工唾液的配比中,氯化钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、柠檬酸、碳酸氢钾、氯化镁和氯化钙分别为 10.00,2.30,2.50,0.15,15.00,1.50,1.50 mmol · L⁻¹,故推测人工唾液中的无机离子可能会影响药物的释放.因为溶液中的离子与纳米粒骨架材料壳聚糖的带电基团有结合作用,离子种类和质量浓度的增加导致其与纳米粒上带电基团的结合力和屏蔽作用增强,顺带改变了纳米粒内部和外部的渗透压,使水分不易渗入粒子内部,从而降低药物的释放速率和程度.

对缓释制剂进行药物释放机制及数学模型的研究有助于预测其在体内的释放行为.对 t-Res-NPs 的累计释放曲线进行 4 种释药数据模型(零级动力学、一级动力学、Higuchi 方程和 Korsmeyer-Peppas 方程)拟合可知,Korsmeyer-Peppas 方程符合其体外释放规律.在 Korsmeyer-Peppas 方程中,当拟合参数 $n \leq 0.450$ 时,制剂的释药机制为 Fick 扩散;当 $0.450 < n < 0.890$ 时,制剂的释药机制为 non-Fick 扩散;而当 $n \geq 0.890$ 时,制剂的释药机制为骨架溶蚀^[14].在人工胃液、人工肠液、人工唾液等介质中,Korsmeyer-Peppas 拟合方程的 n 值分别为 0.464,0.463,0.429.由此可知,t-Res-NPs 在人工胃液和人工肠液中的释放机制为 Fick 扩散和骨架溶蚀的共同作用,在人工唾液中的释放机制为 Fick 扩散.

在代谢的稳定性实验中,部分检测时间点存在 t-Res 代谢剩余率大于 100% 的情况,究其原因可能有以下 2 点.1) t-Res 在一定的时间内发生轻微降解;2) 在代谢溶液中,由于代谢反应的进行不断生成相关杂质,而降解物质或相关杂质的极性与 t-Res 相近,故降解峰或杂质峰与主峰同时出峰,导致峰面积增大.此问题可在后续实验中借助液相色谱-质谱(LC-MS)联用仪等进行进一步的分析验证.

以口服给药途径进入体内的药物经胃肠道吸收后,经毛细血管进入肝门静脉,在肝脏发生首过效应或首过代谢.在此途径中,大部分药物会在肠道菌群和代谢酶的催化下发生不同程度的生物转化.因此,在药物代谢领域研究的药物体外代谢模型主要以肝脏和肠道为基础,其中,最常用的肠道菌群代谢研究为粪便温孵法,肝脏代谢研究为肝匀浆孵育法.文中借助药物代谢领域的研究方法,考察了 t-Res 及其制剂在肠道菌群和肝匀浆中的稳定性.实验结果表明,肠道菌群不参与白藜芦醇及其制剂的代谢;在肝匀浆中温孵 360 min 的 t-Res 代谢剩余率为 2.22%,制剂中的 t-Res 代谢剩余率为 83.77%,证明将 t-Res 制成纳米粒剂型可以有效地保护药物,减慢其代谢速率.该方法可用于评价制剂对药物的保护作用,有助于预测其在体内的代谢行为,为制剂的体外代谢评价提供新思路.

t-Res 的生物利用度问题是制约其临床应用的瓶颈.目前,国内外改善 t-Res 生物利用度的主要制剂学手段是将其制成壳聚糖纳米粒^[15]、自微乳化给药系统^[16]、共晶技术^[17]、纳米乳^[18]及脂质体^[19]等.壳聚糖纳米粒这一制剂学手段在提高生物利用度方面的应用最为广泛.t-Res 的相关制剂学文献均将重点放在制剂的制备及理化性质上,而未对其进行稳定性研究.文中不仅进行制备方法的优化研究,还补充了该制剂的体外评价,完善已有研究的不足,为相关研究提供参考.

文中将药物代谢领域的研究方法应用于制剂学领域,对所得产品进行评价是一种新尝试.该方法可用于评价制剂对药物的保护作用.通过体外代谢稳定性实验预测其在体内的代谢行为,节省了人力、物力,提高了药物剂型开发的速率和成功率,为制剂的体外代谢评价提供新思路.然而,由于实验仅针对壳聚糖纳米粒,样本量过少而无法评判方法对于其他剂型的普适性和稳定性,还需在后续的工作中多进行不同剂型的体外代谢稳定性研究,进一步完善该方法.

参考文献:

- [1] CARTER L G,D'ORAZIO J A,PEARSON K J. Resveratrol and cancer: Focus on *in vivo* evidence[J]. *Endocr Relat Cancer*,2014,21(3):R209-R225. DOI:10.1530/ERC-13-0171.
- [2] MALHOTRA A,NAIR P,DHAWAN D K. Study to evaluate molecular mechanics behind synergistic chemo-pre-

- ventive effects of curcumin and resveratrol during lung carcinogenesis[J]. Plos One, 2014, 9(4): e93820. DOI: 10.1371/journal.pone.0093820.
- [3] 黄诗琪, 杨梦, 童玲, 等. 白藜芦醇对小鼠结肠癌细胞 CT26 增殖的影响[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2018, 38(10): 1162-1166. DOI: 10.3969/j.issn.1674-8115.2018.10.005.
- [4] DOLINSKY V W, CHARKRABARTI S, PEREIRA T J, *et al.* Resveratrol prevents hypertension and cardiac hypertrophy in hypertensive rats and mice[J]. BBA-Molecular Basis of Disease, 2013, 1832(10): 1723-1733. DOI: 10.1016/j.bbadis.2013.05.018.
- [5] 陈明亮. 白藜芦醇通过重塑肠道菌群改善动脉粥样硬化的作用及机制研究[D]. 重庆: 第三军医大学, 2016.
- [6] 邓洁, 唐旻, 文红波, 等. 白藜芦醇保护心血管作用机制的研究进展[J]. 医学综述, 2018, 24(14): 2759-2764. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2084.2018.14.011.
- [7] LEE T H, SEO J O, BAEK S H, *et al.* Inhibitory effects of resveratrol on melanin synthesis in ultraviolet B-induced pigmentation in guinea pig skin[J]. Biomolecules and Therapeutics, 2014, 22(1): 35-40. DOI: 10.4062/biomolther.2013.081.
- [8] 严建业, 王元清, 黄丹, 等. HPLC-DAD 测定虎杖苷、白藜芦醇、大黄的平衡溶解度及表观油水分配系数[J]. 中成药, 2015, 37(12): 2628-2632. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1528.2015.12.012.
- [9] ROTCHES-RIBALTA M, ANDRES-LACUEVA C, ESTRUCH R, *et al.* Pharmacokinetics of resveratrol metabolic profile in healthy humans after moderate consumption of red wine and grape extract tablets[J]. Pharmacological Research, 2012, 66(5): 375-382. DOI: 10.1016/j.phrs.2012.08.001.
- [10] WALLE T. Bioavailability of resveratrol[J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2011, 1215(1): 9-15. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2010.05842.x.
- [11] WALLE T, HSIEH F, DELEGGE M H, *et al.* High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans[J]. Drug Metabolism and Disposition the Biological Fate of Chemicals, 2004, 32(12): 1377-1382. DOI: 10.1124/dmd.104.000885.
- [12] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015 年版 四部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.
- [13] MORJARIA Y, IRWIN W J, BARNETT P X, *et al.* *In vitro* release of nicotine from chewing gum formulations[J]. Dissolution Technologies, 2004, 11(2): 12-15. DOI: 10.14227/DT110204P12.
- [14] DASH S, MURTHY P N, NATH L, *et al.* Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems[J]. Acta Poloniae Pharmaceutica, 2010, 67(3): 217-223.
- [15] 姚倩, 侯世祥, 卢懿, 等. 白藜芦醇壳聚糖纳米粒的制备及理化性质[J]. 中国药理学杂志, 2009, 44(6): 444-447.
- [16] MAMADOU G, CHARRUEAU C, DAIROU J, *et al.* Increased intestinal permeation and modulation of presystemic metabolism of resveratrol formulated into self-emulsifying drug delivery systems[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2017, 521(1/2): 150-155. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2017.02.036.
- [17] ZHOU Zhengzheng, LI Wanying, SUN W J, *et al.* Resveratrol cocrystals with enhanced solubility and tabletability[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2016, 509(1/2): 391-399. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2016.06.006.
- [18] TSAI M J, LU I J, FU Y S, *et al.* Nanocarriers enhance the transdermal bioavailability of resveratrol: *In-vitro* and *in-vivo* study[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2016, 148: 650-656. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2016.09.045.
- [19] VIJAYAKUMAR M R, VAJANTHRI K Y, BALAVIGNESWARAN C K, *et al.* Pharmacokinetics, biodistribution, *in vitro* cytotoxicity and biocompatibility of vitamin E TPGS coated trans resveratrol liposomes[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2016, 145: 479-491. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2016.05.037.

(责任编辑: 钱筠 英文审校: 刘源岗)