

• 药剂与工艺 •

白藜芦醇脂质体的制备及经鼻腔给药评价

王新敏, 黄丽珍, 岳鹏飞*, 胡文慧, 郑 琴, 陈颖翀*

江西中医药大学, 现代中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330004

摘要: 目的 制备白藜芦醇脂质体 (resveratrol-liposomes, Res-Lip), 并考察经鼻腔给药的药动学行为。方法 通过单因素考察氢化大豆卵磷脂 (HSPC) 与胆固醇质量比、药脂比、药物含量、超声功率及超声时间对 Res-Lip 的粒径和包封率的影响, 优化处方, 以得到粒径分布均匀、稳定的 Res-Lip。采用 LC-MS/MS 测定大鼠经鼻腔给药的血药浓度, 初步评价 Res-Lip 在大鼠体内的药动学特征。结果 采用薄膜分散法, 以 HSPC 与胆固醇质量比为 3 : 1、药脂比为 1 : 16、药物含量为 30 mg、超声功率为 550 W、超声时间为 6 min 制备的脂质体平均粒径为 (75.25 ± 0.33) nm, ζ 电位为 (-33.80 ± 0.74) mV, 包封率达到 $(92.94 \pm 0.32)\%$ 。Res-Lip 经鼻腔给药后, 相比于口服给药, 药物清除半衰期 ($t_{1/2}$) 提高了 2.11 倍, 最大血药浓度 ($C_{\max}$) 提高了 1.94 倍, 滞留时间延长 2.42 倍。结论 使用薄膜分散法制备的 Res-Lip, 能有效增强白藜芦醇的稳定性与溶解度, 提高其在体内的生物利用度, 为白藜芦醇新剂型的开发具有一定的参考价值。

关键词: 白藜芦醇; 脂质体; 包封率; 鼻腔给药; 药动学研究

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253 - 2670(2024)16 - 5428 - 09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.16.006

Preparation of resveratrol liposomes and evaluation of transnasal drug delivery

WANG Xinmin, HUANG Lizhen, YUE Pengfei, HU Wenhui, ZHENG Qin, CHEN Yingchong

Key Laboratory of Modern Preparation of TCM, Ministry of Education, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

Abstract: **Objective** To prepare resveratrol-liposomes (Res-Lip), and study its the pharmacokinetics behavior by intranasal administration. **Methods** The effects of hydrogenated soy phosphatidylcholine (HSPC)-cholesterol ratio, drug-lipid ratio, drug content, ultrasounic power and ultrasound time on the particle size and encapsulation efficiency of Res-Lip were investigated by single factor test. The prescription was optimized to obtain uniformly distributed and stable of Res-Lip. The blood concentration of Res-Lip administered nasally to rats was determined by LC-MS/MS, and the pharmacokinetic characteristics of Res-Lip were evaluated *in vivo* in the preliminary study. **Results** The average particle size of liposomes was (75.25 ± 0.33) nm, the ζ potential was (-33.80 ± 0.74) mV, and the encapsulation rate reached $(92.94 \pm 0.32)\%$ using the thin film dispersion method with HSPC-cholesterol ratio of 3 : 1, drug-lipid ratio of 1 : 16, drug content of 30 mg, ultrasounic power of 550 W, and ultrasound time of 6 min. Res-Lip administered nasally resulted in a 2.11-fold increase in $t_{1/2}$, a 1.94-fold increase in $C_{\max}$, and a 2.42-fold prolongation of retention time compared to oral administration. **Conclusion** The Res-Lip prepared by the film dispersion method can effectively enhance the stability and solubility of resveratrol, and improve its bioavailability *in vivo*, which has certain reference value for the development of new formulation for resveratrol.

Key words: resveratrol; liposomes; encapsulation efficiency; nasal delivery; pharmacokinetic studies

收稿日期: 2024-03-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82260816); 江西省自然科学基金资助项目 (20202BAB216038); 江西省自然科学基金资助项目 (20202ACB206011); 江西中医药大学博士启动基金 (2018WBZR001); 国家中医药管理局“青年岐黄学者”培养计划 (2022256); 江西中医药大学大学生创新创业训练计划项目 (X202310412222)

作者简介: 王新敏, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药新剂型与新技术。E-mail: wangximin2021@163.com

***通信作者:** 岳鹏飞, 男, 博士生导师, 研究方向为中药新技术与新产品开发。Tel: (0791)87118658 E-mail: ypfpharm@126.com

陈颖翀, 女, 博士生导师, 研究方向为中药新剂型与新技术。Tel: (0791)87118658 E-mail: yc_chen1020@163.com

白藜芦醇(resveratrol)是一种具有生物活性的非黄酮类多酚化合物,主要存在于葡萄、坚果和浆果等植物中^[1]。研究表明,白藜芦醇具有抗癌^[2-3]、抗氧化^[4]、抗炎^[5]、神经保护^[6]等生理活性,但由于其吸收迅速、生物利用度低及水溶性差等问题,严重限制了其在临床上的应用^[7]。为解决以上问题,药学工作者们研究并开发了多种白藜芦醇新剂型,主要有纳米粒^[8]、纳米乳^[9-10]、微囊^[11]、凝胶剂^[12]、共晶水合物^[13]等,这些纳米制剂技术能有效改善白藜芦醇水溶性差的问题,但仍存在一些不足,如纳米粒存在稳定性差的问题^[14];纳米乳使用大量的表面活性剂,可能存在安全性问题;微囊对工艺要求较高,在实际生产应用过程中会存在成本高、重现性差等难题,难以实现临床应用^[15];因而需要寻找一种新的纳米制剂技术以解决以上问题。脂质体(liposomes, Lip)作为一种新型药物载体,既可包载水溶性药物又可包载脂溶性药物^[16],同时具有提高难溶性药物的生物利用度和稳定性等特点。将白藜芦醇包载于脂质体内,可有效提高白藜芦醇的稳定性和水溶性,进而提高其生物利用度^[17]。研究表明白藜芦醇口服生物利用度低于 5%^[18],其口服后会通过被动扩散或载体介导的跨细胞顶端转运而被肠道细胞大量吸收,迅速广泛地代谢生成葡萄糖醛酸苷和硫酸盐结合物^[19],故白藜芦醇需要通过一种新的给药系统来解决其口服吸收速度快的不足。鼻腔给药是一种药物经鼻黏膜吸收来治疗局部或全身性疾病的安全、有效的方式,可在药物吸收后直接进入体循环,减少不良反应;与口服给药相比,鼻腔给药可避免肝脏首过效应,且脂质体能延长药物在鼻腔内的释放时间,在减少频繁用药的同时提高其药效^[20]。因此,本课题通过薄膜分散法制备白藜芦醇脂质体(resveratrol-liposomes, Res-Lip),以粒径、 ζ 电位、包封率为指标筛选出最佳制备及处方工艺,并经鼻腔给药评价其在大鼠体内药动学研究,以期为提高白藜芦醇生物利用度提供理论依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

EL104 型电子天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;N-1001 型旋转蒸发仪,上海爱朗仪器有限公司;JY92-IIN 型超声波细胞粉碎机,宁波新芝生物科技股份有限公司;KQ-300E 型超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;TGL-20MC 型高速离心机,湖南湘鑫仪器仪表有限公司;Zetasizer

Nano-S 型纳米粒度仪及分析软件,英国 Malvern 公司;Triple Quda 4500 型液质联用仪,AB Sciex 公司;Welch Ultimate XB-C₁₈ 型质谱柱,上海月旭科技有限公司。

1.2 药品和试剂

白藜芦醇对照品,质量分数>98%,南京泽朗生物科技有限公司;氢化大豆卵磷脂(HSPC),批号 B60455,艾维拓医药科技有限公司;胆固醇,批号 624J034,北京索莱宝科技有限公司;十二烷基硫酸钠(SDS),批号 R007226,上海凇恩科技发展有限公司;三氯甲烷,批号 202304171,西陇科学股份有限公司;甲醇和乙腈,色谱级,湖北弗顿生化科技有限公司。

1.3 动物

健康 SPF 级雄性 SD 大鼠(湘-XQ240),12 只,体质量(220±20)g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,许可证号为 SCXK(湘)2019-0004。所有动物实验遵循江西中医药大学动物实验伦理委员会有关实验动物管理和使用的规定,符合 3R 原则。

2 方法与结果

2.1 脂质体的制备

2.1.1 空白脂质体的制备 精密称取 HSPC 360 mg,胆固醇 120 mg 于 250 mL 圆底烧瓶中,加入 20 mL 三氯甲烷溶解后,于旋转蒸发仪上 60℃ 下蒸干成膜,加入 pH 6.5 的 PBS 缓冲液 10 mL,充分水合,通过超声波细胞粉碎机超声 6 min,即得空白脂质体。

2.1.2 Res-Lip 的制备 精密称取 HSPC 360 mg,胆固醇 120 mg,白藜芦醇 30 mg 于 250 mL 圆底烧瓶中,加入 20 mL 三氯甲烷溶解,于旋转蒸发仪上 60℃ 下蒸干成膜,加入 pH 6.5 的 PBS 缓冲液 10 mL,充分水合,超声 6 min,即得 Res-Lip 脂质体。

2.2 Res-Lip 中白藜芦醇含量测定方法

2.2.1 色谱条件 Agilent 1260 HPLC 系统化学工作站,UV 检测器,美国 Agilent 公司;色谱柱为 ACE Excel C₁₈ 柱(250 mm×4.8 mm, 5.0 μm);流动相为乙腈-水(30:70);检测波长 306 nm;柱温 30℃;体积流量 1 mL/min;进样量 20 μL。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取 10 mg 白藜芦醇对照品于 50 mL 量瓶中,用流动相定容,水浴超声,取 1 mL 过 0.22 μm 有机微孔滤膜于进样瓶,即制得 200 μg/mL 对照品溶液。

2.2.3 Res-Lip 样品溶液的制备 取 2 mL Res-Lip 溶液于 50 mL 量瓶中,用流动相定容,水浴超声,

取 1 mL 过 0.22 μm 有机微孔滤膜于进样瓶, 即制得 Res-Lip 样品溶液。

2.2.4 专属性考察 取用乙腈破乳后的空白脂质体溶液和配制好的白藜芦醇对照品溶液以及 Res-Lip 样品溶液, 过 0.22 μm 有机微孔滤膜, 按照“2.1.1”项下色谱条件分别进样, 记录色谱图(图 1), 实验结果表明此色谱条件下, 白藜芦醇峰形较好, 无其他干扰。

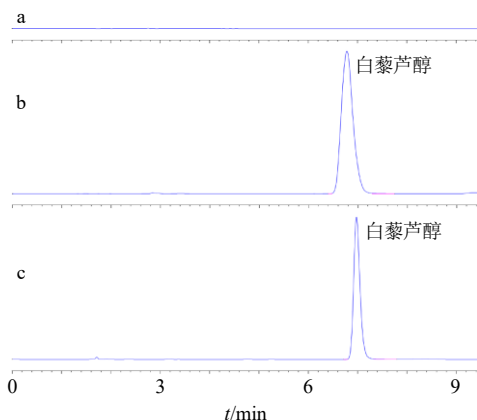


图 1 空白脂质体溶液 (a)、白藜芦醇对照品溶液 (b) 及 Res-Lip 样品溶液 (c) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of blank liposome solution (a), resveratrol control solution (b) and Res-Lip solution (c)

2.2.5 线性关系考察 取“2.2.2”项下对照品溶液, 以此为母液, 稀释成质量浓度分别为 10、20、40、80、100、120、140、160、200 $\mu\text{g/mL}$ 的系列对照品溶液, 按照“2.1.1”项下色谱条件进样分析, 记录色谱峰面积。以质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y) 进行线性回归, 所得线性方程为 $Y=104.63 X-293.72$, $R^2=0.999 3$, 结果表明白藜芦醇在 10~200 $\mu\text{g/mL}$ 呈良好的线性关系。

2.2.6 精密度考察 精密量取低、中、高 (20、100、200 $\mu\text{g/mL}$) 3 个质量浓度的白藜芦醇对照品溶液, 按照“2.2.1”项下色谱条件, 分别于 1、3、5 d 各进样 6 次, 记录峰面积, 考察日内、日间精密度。结果测得低、中、高 3 个质量浓度对照品溶液的日内精密度分别为 0.33%、0.12%、0.15%, 日间精密度分别为 0.14%、0.04%、0.15%。

2.2.7 重复性考察 按照“2.2.3”项下方法平行制备 6 份 Res-Lip 样品溶液, 按照“2.2.1”项下色谱条件进样分析, 记录峰面积。计算得 RSD 值为 0.58%, 表明该方法具有良好的重复性。

2.2.8 稳定性考察 取 Res-Lip 溶液, 按照“2.2.3”项下制备 Res-Lip 样品溶液, 分别于 0、4、8、12、

24 h 取样 1 mL, 按照“2.2.1”项下色谱条件进样分析, 记录峰面积。计算得 RSD 值为 1.32%, 表明 Res-Lip 样品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.9 加样回收率考察 精密吸取 6 份已测定白藜芦醇质量浓度的 Res-Lip 溶液各 1 mL, 加入白藜芦醇对照品溶液 (200 $\mu\text{g/mL}$) 1 mL, 混合均匀, 按照“2.2.1”项下色谱条件, 每个样品进样 3 次, 记录峰面积, 根据标准曲线计算加样回收率为 101.2%, RSD 值为 0.17%。

2.3 Res-Lip 的制备方法及其优化

2.3.1 包封率、粒径、 ζ 电位的测定 采用超滤法测定包封率^[21]。精密吸取 0.5 mL Res-Lip 于超滤离心管 (截留相对分子质量 10 000) 中, 于 10 000 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 min 条件下离心 (离心半径 6.2 cm), 吸取滤液, 按照“2.2.1”项下色谱条件进行分析, 记录峰面积。取 Res-Lip 溶液 0.1 mL, 加入 2 mL 超纯水稀释, 摇匀后取适量置于比色皿中, 用马尔文纳米粒度仪分别测定其粒径、多分散系数 (polydispersity index, PDI) 及 ζ 电位。

2.3.2 Res-Lip 制备方法考察 分别采用薄膜分散法、乙醇注入法制备 Res-Lip, 以粒径、 ζ 电位及包封率为指标, 考察 Res-Lip 的制备方法, 方法如下。

(1) 薄膜分散法: 精密称取 HSPC 360 mg, 胆固醇 120 mg, 白藜芦醇 30 mg 于 250 mL 圆底烧瓶中, 加入 20 mL 三氯甲烷, 于旋转蒸发仪上 60 $^{\circ}\text{C}$ 下蒸干成膜, 加入 pH 6.5 的 PBS 缓冲液 10 mL, 充分水合, 超声 6 min, 即得 Res-Lip。

(2) 乙醇注入法: 精密称取 HSPC 360 mg, 胆固醇 120 mg, 白藜芦醇 30 mg 于烧杯中, 加入 10 mL 无水乙醇, 搅拌使其溶解, 作为 A 溶液; 取圆底烧瓶, 加入 10 mL pH 6.5 的 PBS 缓冲液, 作为 B 溶液; 将 A 溶液于 40 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴条件下缓慢滴加入 B 溶液中, 慢速搅拌 20 min 后, 将 B 溶液 (不需封口) 置于水浴中保温, 50 min 后取出, 超声 6 min, 即得 Res-Lip。

(3) 考察结果: 由表 1 可知, 采用乙醇注入法制

表 1 制备方法的考察 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Examination of preparation methods ($\bar{x} \pm s, n=3$)

制备方法	粒径/nm	ζ 电位/mV	包封率/%
薄膜分散法	123.40 $\pm$ 6.09****	-29.00 $\pm$ 0.70	70.71 $\pm$ 0.52****
乙醇注入法	329.20 $\pm$ 1.69	-34.10 $\pm$ 1.93	45.17 $\pm$ 0.84

与乙醇注入法比较: **** $P<0.000 1$ 。

**** $P<0.000 1$ vs ethanol injection method.

备 Res-Lip 的包封率仅为 $(45.17 \pm 0.84)\%$ ，粒径为 (329.20 ± 1.69) nm；薄膜分散法制备 Res-Lip 的包封率为 $(70.71 \pm 0.52)\%$ ，其粒径为 (123.40 ± 6.09) nm，与乙醇注入法相比具有显著性差异 ($P < 0.0001$)。使用乙醇注入法制备的脂质体包封率较低，且有机溶剂残留难以清除完全，存在使用安全性问题，因此选择薄膜分散法制备 Res-Lip。

2.3.3 HSPC 与胆固醇质量比考察 精密称取 HSPC 与胆固醇质量比分别为 1:1、2:1、3:1、4:1，采用薄膜分散法制备 Res-Lip，测定其粒径、 ζ 电位及包封率，结果见表 2。由结果可知，随着 HSPC 与胆固醇比例的增加，粒径先减小后增大，当比例为 3:1 时，粒径较小，包封率相对较高。表明在一定比例范围内，HSPC 比例越高，脂质体粒径相对较小，包封率有所增加，但过多的 HSPC 可能会致使制备过程中分散困难，包封率不升反降，因此选择 HSPC 与胆固醇质量比为 3:1。

表 2 HSPC 与胆固醇质量比考察 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Examination of mass ratio of HSPC to cholesterol ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

HSPC 与胆固醇质量比	粒径/nm	ζ 电位/mV	包封率/%
1:1	163.20 ± 1.27	-27.00 ± 0.23	71.27 ± 0.54
2:1	109.80 ± 2.85	-29.30 ± 1.36	72.76 ± 0.13
3:1	86.69 ± 0.96	-29.20 ± 1.05	73.33 ± 0.38
4:1	101.40 ± 1.22	-25.70 ± 0.92	72.63 ± 0.32

2.3.4 药脂比的考察 精密称取药物与脂质体质量比分别为 1:10、1:12、1:14、1:16、1:18，采用薄膜分散法制备 Res-Lip，测定粒径、 ζ 电位及包封率。由表 3 可知，随着药脂比的增加，包封率先下降后又上升，推测为药物含量的增多，使更多药物包封在脂质体中，但过多或过少的药物含量均会导致脂质体包载药物不均匀，使部分药物游离在脂质体外，使其包封率下降。当药脂比为 1:16 时，

表 3 药脂比的考察 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Examination of drug-lipid ratio ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

药脂比	粒径/nm	ζ 电位/mV	包封率/%
1:10	121.50 ± 0.71	-29.30 ± 1.36	71.58 ± 0.42
1:12	113.00 ± 5.52	-30.70 ± 1.59	71.28 ± 0.26
1:14	118.90 ± 5.30	-29.20 ± 1.05	71.62 ± 0.88
1:16	109.50 ± 8.20	-29.30 ± 1.36	72.28 ± 0.63
1:18	113.80 ± 1.27	-27.00 ± 0.23	72.33 ± 0.28

粒径相对较小， ζ 电位相对较大，包封率较其他药脂比的脂质体也较高，因此，选择药脂比为 1:16 进行载药。

2.3.5 药物含量的考察 精密称取白藜芦醇原料药 10、30、60、90 mg (载药量分别为 1、3、6、9 mg/mL)，采用薄膜分散法制备 Res-Lip，测定其粒径、 ζ 电位及包封率，结果见表 4。由结果可知，随着药物含量的增加，粒径先减小后增大，包封率有所下降，且 ζ 电位不断减小，推测为药物含量过多，脂质体无法将部分药物包载其中，致使大量药物游离在溶液中。当药物含量为 30 mg 时，包封率相对较高，综合粒径、 ζ 电位及包封率结果，选择药物含量为 30 mg (载药量为 3 mg/mL)。

表 4 药物含量的考察 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Examination of drug content ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

药物含量/mg	粒径/nm	ζ 电位/mV	包封率/%
10	124.40 ± 3.25	-38.20 ± 3.82	73.13 ± 0.91
30	99.88 ± 6.72	-29.60 ± 1.25	72.13 ± 0.30
60	196.50 ± 1.30	-29.55 ± 0.65	69.81 ± 0.08
90	191.36 ± 1.03	-25.20 ± 2.10	67.46 ± 0.05

2.3.6 超声功率的考察 采用薄膜分散法制备 Res-Lip，保持其他条件不变，仅改变超声细胞粉碎机的超声功率，分别测定超声功率为 650、550、450、350、250 W 时 Res-Lip 的粒径、 ζ 电位及包封率，结果见表 5。由结果可知，随着超声功率的增加，粒径先减小后增大，包封率有所降低，这可能是超声探头发出的能量受到粒子影响，在容器中分布不均匀，需要达到一定功率，才能降低脂质体的粒径，提高脂质体的分散性。超声功率为 550 W 时，粒径最小， ζ 电位绝对值相对较大，包封率与其他超声功率下的相差较小，因此选择超声功率 550 W 为最终超声功率。

2.3.7 超声时间的考察 采用薄膜分散法制备 Res-Lip，保持其他条件不变，分别测定超声时间为 3、

表 5 超声功率的考察 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Investigation of ultrasonic power ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

超声功率/W	粒径/nm	ζ 电位/mV	包封率/%
250	171.40 ± 1.76	-29.90 ± 0.26	73.15 ± 0.71
350	157.60 ± 1.27	-27.70 ± 0.74	72.13 ± 0.30
450	129.90 ± 1.87	-31.50 ± 0.36	72.67 ± 0.88
550	127.30 ± 1.96	-32.70 ± 0.90	72.47 ± 0.41
650	185.40 ± 0.88	-29.10 ± 0.72	71.20 ± 0.72

6、9、12、15 min 时 Res-Lip 的粒径、 ζ 电位及包封率。由表 6 可知, 随着超声时间延长, 脂质体粒径有所减小, 表明随着超声时间延长能够降低脂质体的粒径, 增大 ζ 电位, 但超声时间为 9 min 时, 粒径明显增加, 包封率变化不大。同时考虑到长时间超声对仪器探头的磨损, 且时间过长会产生较多金属沉淀造成磷脂易氧化, 故选择超声时间为 6 min。

表 6 超声时间的考察 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 6 Examination of ultrasound time ($\bar{x} \pm s, n = 3$)			
超声时间/min	粒径/nm	ζ 电位/mV	包封率/%
3	145.20 $\pm$ 1.11	-26.10 $\pm$ 0.68	72.13 $\pm$ 0.42
6	127.00 $\pm$ 1.25	-28.10 $\pm$ 0.18	72.13 $\pm$ 0.30
9	163.40 $\pm$ 1.77	-28.70 $\pm$ 0.83	71.18 $\pm$ 0.79
12	120.90 $\pm$ 1.45	-29.50 $\pm$ 0.54	72.20 $\pm$ 0.34
15	114.7 $\pm$ 2.042	-30.00 $\pm$ 0.70	71.24 $\pm$ 0.66

2.3.8 最佳工艺的确定及其验证 因此, 综合脂质体粒径、 ζ 电位及包封率考虑, 采用薄膜分散法, 以 HSPC 与胆固醇质量比 3 : 1、药脂比 1 : 16、药物含量 30 mg (载药量 3 mg/mL) 为最佳处方工艺, 以超声功率 550 W, 超声时间 6 min 为最佳制备工艺, 成功制备出 Res-Lip, 其平均粒径为 (75.25 $\pm$ 0.33) nm ($n = 3$), 粒径呈正态分布 (图 2), PDI 为 0.110 $\pm$ 0.003 ($n = 3$), ζ 电位为 (-33.80 $\pm$ 0.74) mV ($n = 3$)。

2.4 Res-Lip 的表征评价

2.4.1 外观 采用薄膜分散法用优化后的处方制备的 Res-Lip, 呈现为均一稳定的微乳黄色液体 (图 3)。

2.4.2 TEM 形态分析 取适量 Res-Lip, 加入超纯水稀释后, 取 10 μ L 滴加至专用铜网上, 静置自然挥干后, 用 2% 磷钨酸染色, 采用 TEM 观察其形态。结果如图 4 所示, 可见 Res-Lip 呈现均匀球形, 轮廓形状清晰, 是一种具有类脂质双分子层的微型泡囊体。

2.4.3 Res-Lip 的稳定性考察 将 Res-Lip 放置在

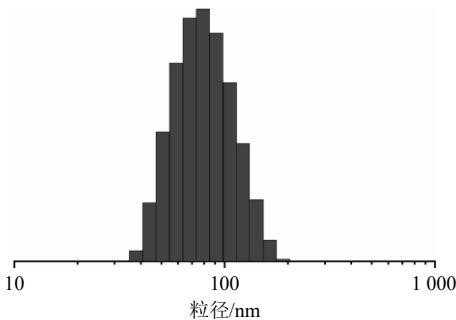


图 2 Res-Lip 的粒径分布
Fig. 2 Particle size distribution of Res-Lip



图 3 Res-Lip 的外观图
Fig. 3 Appearance of Res-Lip solution

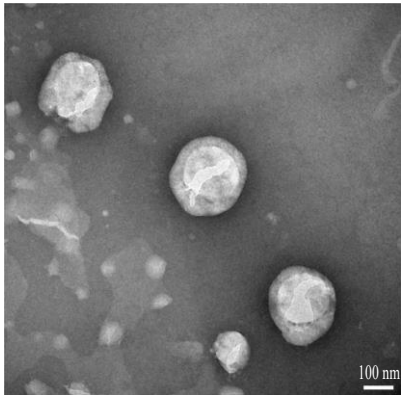


图 4 Res-Lip 透射电镜观察
Fig. 4 Transmission electron microscopy of Res-Lip

4 $^{\circ}$ C 阴凉柜中, 分别于第 1、3、5、7 天取出观察外观, 并测定脂质体的粒径、包封率及泄漏率^[22], 考察 Res-Lip 的稳定性。结果表明, Res-Lip 在 4 $^{\circ}$ C 环境下放置 7 d, 外观无明显变化 (图 5 和表 7), 粒径、 ζ 电位 7 d 内变化幅度较小, 包封率变化不足

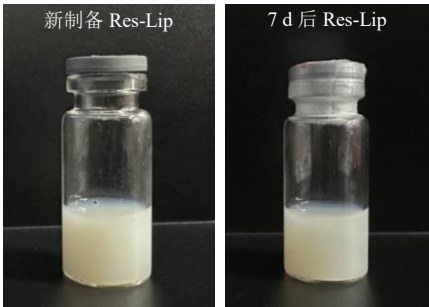


图 5 Res-Lip 的外观图
Fig. 5 Appearance diagram of Res-Lip

表 7 Res-Lip 稳定性考察结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 7 Results of Res-Lip stability ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

t/d	粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV	包封率/%	渗漏率/%
1	79.40 $\pm$ 0.72	0.13 $\pm$ 0.015	-29.60 $\pm$ 1.25	92.39 $\pm$ 0.66	0.60 $\pm$ 0.06
3	78.22 $\pm$ 1.29	0.12 $\pm$ 0.006	-30.81 $\pm$ 0.80	90.17 $\pm$ 0.43	2.98 $\pm$ 0.13
5	78.87 $\pm$ 0.78	0.15 $\pm$ 0.023	-30.82 $\pm$ 0.79	89.29 $\pm$ 0.41	3.94 $\pm$ 0.11
7	82.31 $\pm$ 2.12	0.15 $\pm$ 0.019	-30.54 $\pm$ 0.09	88.65 $\pm$ 0.46	4.63 $\pm$ 0.82

2%，泄漏率低于 5%，说明 Res-Lip 在短时间储存稳定性良好。

泄漏率=(新制备测得的包封率-储存过程中测得的包封率)/新制备测得的包封率

2.4.4 体外释放实验 采用透析袋法进行体外释放实验。取 1 mg 白藜芦醇置于 10 mL 量瓶中，加无水乙醇溶解并稀释至刻度，作为白藜芦醇溶液。分别精密吸取 5 mL Res-Lip 和白藜芦醇溶液于透析袋中，用夹子将两端夹紧，分别放到装有 100 mL 0.5% SDS 溶出介质的烧杯中，分别于 0.083、0.167、0.25、0.5、0.75、1、2、4、6、8、10、12、24、36、48 h 取样 1 mL，并补 1 mL 同温度的溶出介质，过 0.22 μm 微孔滤膜，按照“2.2.1”项色谱条件下进样分析，记录峰面积，计算样品的体外累积释放率，并对其体外释药动力学模型拟合。由图 6 和表 8 可知，白藜芦醇溶液释放相对较快，12 h 累积释放率达到 97% 以上，但在 24 h 后其累积释放率逐渐降低，这可能与白藜芦醇稳定性差、易降解有关^[23]。而 Res-Lip 在 12 h 时的累积释放率为 75.66%，呈缓

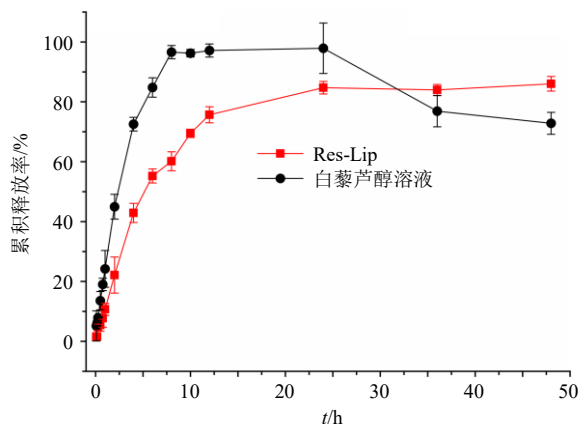


图 6 白藜芦醇溶液和 Res-Lip 的体外释放曲线 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 6 *In vitro* release profiles of resveratrol solution and Res-Lip ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

表 8 体外释药动力学拟合方程 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 8 *In vitro* release kinetics fitting equations ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

样品	模型	拟合方程	R^2
Res-Lip	零级方程	$Q=2.460\ 5\ t+6.759\ 6$	0.709 6
	一级方程	$\lg Q=0.028\ 4\ t+1.026\ 3$	0.373 7
	Higuchi 方程	$Q=16.837\ 9\ t^{1/2}-3.206\ 1$	0.914 0
白藜芦醇溶液	零级方程	$Q=3.993\ 4\ t+7.989\ 6$	0.487 4
	一级方程	$\lg Q=0.038\ 3\ t+0.812\ 1$	0.540 0
	Higuchi 方程	$Q=13.347\ 8\ t^{1/2}+21.538\ 7$	0.511 4

慢释放的趋势。拟合方程结果显示，Res-Lip 符合 Higuchi 动力学模型，表明白藜芦醇制成脂质体剂型后，可明显延缓白藜芦醇释放，延长药物的作用时间，具有显著的缓控释作用。

2.5 Res-Lip 经鼻腔给药动力学研究

2.5.1 给药及血样采集方案 取 12 只 SD 大鼠，在 SPF 级环境适应性喂养 1 周，实验前 12 h 禁食但可自由取水，随机分成 2 组，每组 6 只。按等剂量白藜芦醇 (20 mg/kg) 分别鼻腔给药等剂量 (200 μL) Res-Lip 溶液和口服给药等剂量 (2 mL) Res-Lip 溶液。分别于给药后 0.083、0.167、0.25、0.5、0.75、1、2、4、8 h，从大鼠眼底静脉丛取血约 0.5 mL，置于 1.5 mL 抗凝离心管中，上下轻轻振摇，4 000 r/min，4 ℃ 离心 (离心半径 6.2 cm) 10 min，吸取上清液于 1.5 mL 离心管中，得含药血浆。

2.5.2 色谱与质谱条件

(1) 色谱条件：色谱柱为 Welch Ultimate XB-C₁₈ 柱 (150 mm×3.0 mm, 3 μm)；流动相为乙酸铵-乙腈，梯度洗脱程序：0~2.0 min，20%~80% 乙腈；2.0~2.5 min，80%~90% 乙腈；2.5~3.6 min，90%~20% 乙腈；3.6~6.0 min，20% 乙腈；洗脱时间 6 min；体积流量 0.7 mL/min；进样量 2 μL；柱温 40 ℃。

(2) 质谱条件：离子源为电喷雾离子源 (ESI)；喷雾电压为-4 500 V，离子化温度为 600 ℃；碎裂电压 (DP)：白藜芦醇为-60 V，氯唑沙宗为-100 V；碰撞能量 (CE)：白藜芦醇为-30 eV，氯唑沙宗为-37 eV；碰撞气 (CAD) 为 7；检测模式负离子；扫描方式为多反应监测 (multi-reaction monitoring, MRM)；检测反应离子对为 m/z 227.1→185 (白藜芦醇)； m/z 167.9→132 (氯唑沙宗)。

2.5.3 溶液的配制

(1) 对照品溶液：精密称取白藜芦醇对照品 2 mg 于 10 mL 量瓶中，加甲醇超声溶解后定容，摇匀，得 200 μg/mL 的白藜芦醇对照品储备液，避光，4 ℃ 冷藏。用甲醇稀释对照品储备液，得质量浓度分别为 1、10、20、50、100、200、300、400、500、600、700、800 ng/mL 的系列白藜芦醇对照品溶液。

(2) 内标溶液：称取 2 mg 氯唑沙宗于 10 mL 量瓶中，加甲醇超声溶解后定容，摇匀，得 200 μg/mL 的内标储备液，用甲醇稀释后得质量浓度为 6 μg/mL 内标液。

(3) 质控样品：精密吸取 50 μL 空白血浆于 1.5 mL 离心管中，分别加入不同体积的白藜芦醇对照

品储备液，配成含白藜芦醇分别为 20、300、800 ng/mL 的低、中、高 3 个质量浓度的质控样品。

2.5.4 血浆样品的处理 取大鼠血浆 50 μ L，置 1.5 mL 离心管中，精密加入 10 μ L 6 μ g/mL 的氯唑沙宗内标溶液和 190 μ L 甲醇，涡旋混合 5 min，18 000 r/min 离心（离心半径 6.2 cm）30 min，吸取上清液置内插管中，按照“2.5.2”项下色谱条件进行 LC-MS/MS 测定。

2.5.5 方法学考察

(1) 专属性考察：分别取大鼠空白血浆 50 μ L 于 1.5 mL 离心管中，加入 10 μ L 甲醇代替内标溶液，即得空白血浆溶液；加入一定质量浓度的白藜芦醇对照品溶液及内标氯唑沙宗混合标准溶液，即得空白血浆混标溶液；大鼠鼻腔给药后的含药血浆样品均按“2.5.4”项下方法处理，过 0.22 μ m 微孔滤膜，按照“2.5.2”项下色谱条件进样分析，记录色谱图（图 7），实验结果证明此色谱条件下，混标和血样的出峰时间基本一致。

(2) 线性关系考察：用甲醇稀释对照品溶液，制

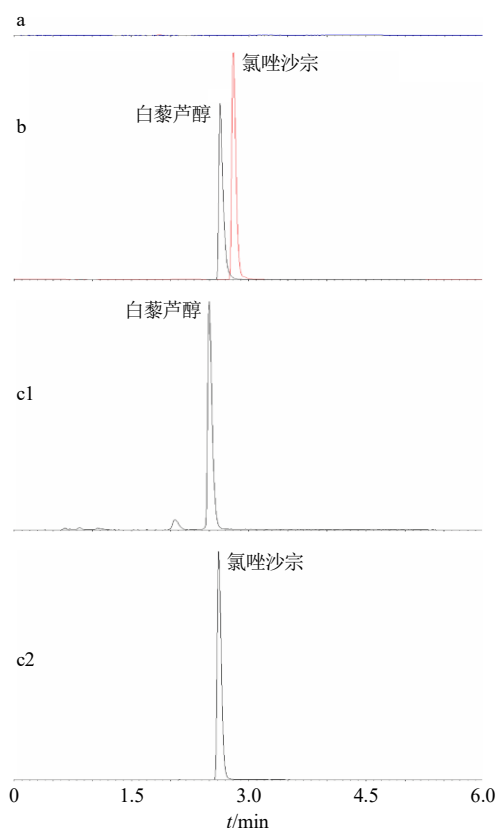


图 7 空白血浆溶液 (a)、空白血浆+混标溶液 (b) 和血浆样品溶液 (c1, c2) 的 HPLC 图

Fig. 7 HPLC of blank plasma (a), blank plasma and mixed standard solution (b) and plasma sample solution (c1, c2)

备质量浓度分别为 1、10、20、50、100、200、300、400、500、600、700、800 ng/mL 的系列对照品溶液，按照“2.5.2”项下色谱条件进样分析，记录峰面积。以质量浓度为横坐标 (X)，峰面积为纵坐标 (Y)，进行线性回归，所得线性回归方程为 $Y=650.77X-0.417$ ， $R^2=0.9995$ ，结果表明白藜芦醇在 1~800 ng/mL 与峰面积具有良好的线性关系。

(3) 精密性考察：取低、中、高 (20、300、800 ng/mL) 3 个质量浓度的白藜芦醇对照品溶液，按照“2.5.2”项下色谱条件，于 1、3、5 d 分别重复进样 6 次，考察日内、日间精密性。结果测得低、中、高 3 个质量浓度白藜芦醇对照品溶液的日内精密性分别为 0.19%、2.12%、13.06%，日间精密性分别为 1.18%、2.60%、5.28%。结果表明，待测组分在大鼠血浆中的精密性和准确度，均满足生物样品分析的需求。

(4) 提取回收率考察：按照“2.5.3”项下方法平行制备 5 份白藜芦醇质量浓度为低、中、高 (20、300、800 ng/mL) 的质控样品溶液，进样分析，得到峰面积。取 50 μ L 空白血浆，按照“2.5.4”项下方法处理，加入 20、300、800 ng/mL 白藜芦醇对照品溶液和内标溶液，涡旋 5 min 后进样检测分析，得到相应峰面积。计算不同质量浓度质控样品中白藜芦醇和氯唑沙宗内标峰面积的比值与对应浓度的样品中白藜芦醇和氯唑沙宗内标峰面积比值的比，即为血浆提取回收率。结果显示低、中、高 3 种质量浓度样品的提取回收率均大于 90%，表明该检测方法提取回收率较好，符合生物样品分析需求。

2.5.6 药动学结果 等剂量 (20 mg/kg) 的 Res-Lip 经鼻腔给药后，不同时间点的大鼠血浆样品中 Res-Lip 的血药浓度相应的药时曲线见图 8。由表 9 不同给药途径的药动参数可知，Res-Lip 经鼻腔给药后，相比于口服给药，药物清除半衰期 (half life, $t_{1/2}$) 提高了 2.11 倍，药时曲线下面积 (area under the plasma concentration-time curve, AUC) 提高了 14.7 倍，最大血药浓度 (C_{max}) 提高了 1.94 倍，平均滞留时间 (mean residence time, MRT) 延长了 2.43 倍，表明鼻腔给药 Res-Lip 后可显著减慢药物在体内的清除，同时显著延长药物在体内的滞留时间，提高了药物在体内的浓度。

3 讨论

白藜芦醇因其丰富的药理作用，在医药及食品保健领域受到极大的关注，但由于其水溶性差、生

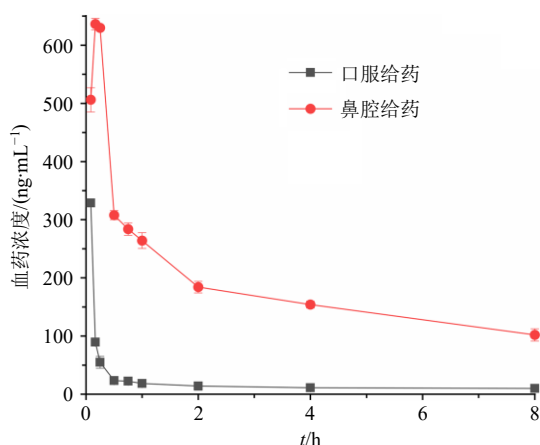


图 8 血药浓度-时间曲线比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 8 Comparison of drug-time curves ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

表 9 不同给药途径的药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 9 Pharmacokinetic parameters for different routes of administration ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

药动学参数	单位	口服给药	鼻腔给药
$t_{1/2}$	h	3.31	6.99
达峰时间 (t_{max})	h	0.08	0.17
C_{max}	ng·mL ⁻¹	328.77	636.36
AUC	ng·h·mL ⁻¹	99.18	1 455.51
MRT	h	3.80	9.22
清除率 (CL)	L·h ⁻¹	0.13	0.01

物利用度低和代谢迅速等问题,在临床应用中受到很大限制。利用脂质体作为药物递送系统是一种安全、生物相容性好的载药方式,具有粒径小、物理化学性质可调、功能化容易、包封率高等特点^[24],可提高白藜芦醇的生物利用度,实现靶向给药。近年来鼻腔给药作为口服给药和注射给药的替代方法,提高了患者的依从性;同时通过鼻-脑通路直接进入脑组织,避免了肝脏首过效应;此外,鼻腔给药可绕过血脑屏障直接递送药物,改善大脑中的位点特异性并避免全身副作用^[20,25-27]。因而鼻腔给药在阿尔兹海默症、帕金森症、癫痫等中枢神经系统疾病的治疗上受到越来越多的关注。

本研究采用薄膜分散法制备 Res-Lip,通过单因素考察研究出最佳处方及制备工艺,最终制备出平均粒径为 (75.25 ± 0.33) nm, ζ 电位为 (-33.80 ± 0.74) mV,包封率达到 $(92.94 \pm 0.32)\%$ 的 Res-Lip。创新性将 Res-Lip 运用于鼻腔给药,大鼠体内药动学研究显示 Res-Lip 经鼻腔给药 C_{max} 可达到 636.36 ng/mL,明显提高了白藜芦醇在体内的浓度。表明 Res-Lip 经鼻腔给药可显著延长药物在体内的滞留

时间,将其应用于中枢神经系统疾病可有效发挥白藜芦醇的神经保护作用,提高其脑靶向性。

综上所述,本研究成功制备了 Res-Lip,且经鼻腔给药显著延长药物在体内的作用时间。但由于鼻腔的独特生理结构及中药制剂的复杂性,后续将从细胞溶血性、鼻黏膜刺激性等评价中药鼻腔给药的安全性。进一步对 Res-Lip 的药效及其机制等进行研究,从给药方式等多方面深入探讨 Res-Lip 的优势。以期为白藜芦醇纳米制剂的开发及应用提供基础借鉴,为中枢神经系统疾病的治疗及研究提供参考价值。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Yu C C, Zhang C G, Guan X F, *et al.* The solid dispersion of resveratrol with enhanced dissolution and good system physical stability [J]. *J Drug Deliv Sci Technol*, 2023, 84: 104507.
- [2] Asemi R, Rajabpoor Nikoo N, Asemi Z, *et al.* Modulation of long non-coding RNAs by resveratrol as a potential therapeutic approach in cancer: A comprehensive review [J]. *Pathol Res Pract*, 2023, 246: 154507.
- [3] 王真, 陈立伟. 白藜芦醇抗肿瘤药理作用机制研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2023, 46(2): 445-452.
- [4] Grujić-Milanović J, Jačević V, Miloradović Z, *et al.* Resveratrol improved kidney function and structure in malignantly hypertensive rats by restoration of antioxidant capacity and nitric oxide bioavailability [J]. *Biomedicine Pharmacother*, 2022, 154: 113642.
- [5] Zordoky B N M, Robertson I M, Dyck J R B. Preclinical and clinical evidence for the role of resveratrol in the treatment of cardiovascular diseases [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1852(6): 1155-1177.
- [6] Farkhakar A, Hassanpour S, Zendehdel M. Resveratrol plays neuroprotective role on ketamine-induced schizophrenia-like behaviors and oxidative damage in mice [J]. *Neurosci Lett*, 2023, 813: 137436.
- [7] 田艳杰, 石爱民, 刘红芝, 等. 白藜芦醇的生物活性及其运载体研究进展 [J]. *食品科学*, 2023, 44(1): 371-379.
- [8] Yang Z Y, McClements D J, Peng X W, *et al.* Fabrication of zein-carboxymethyl cellulose nanoparticles for co-delivery of quercetin and resveratrol [J]. *J Food Eng*, 2023, 341: 111322.
- [9] Jiang Y S, Zang K, Sun J Y, *et al.* Preparation of modified Jiuzao glutelin isolate with carboxymethyl chitosan by ultrasound-stirring assisted Maillard reaction and its

- protective effect of loading resveratrol/quercetin in nano-emulsion [J]. *Ultrason Sonochem*, 2022, 88: 106094.
- [10] 陈聪慧, 张佩语. 双靶向共载紫杉醇及白藜芦醇纳米系统构建及其体外抗多药耐药肿瘤研究 [J]. 中草药, 2022, 53(2): 395-402.
- [11] Xie X D, Jin X W, Huang J J, *et al*. High resveratrol-loaded microcapsules with trehalose and OSA starch as the wall materials: Fabrication, characterization, and evaluation [J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, 242(Pt 2): 124825.
- [12] Elgewelly M A, Elmasry S M, Sayed N S E, *et al*. Resveratrol-loaded vesicular elastic nanocarriers gel in imiquimod-induced psoriasis treatment: *in vitro* and *in vivo* evaluation [J]. *J Pharm Sci*, 2022, 111(2): 417-431.
- [13] 梁玲, 李延广, 郭全虎, 等. 白藜芦醇-盐酸巴马汀共晶水合物的制备、晶体结构及溶解性研究 [J]. 中草药, 2024, 55(11): 3659-3667.
- [14] 谢元彪, 许俊男, 陈颖翀, 等. 纳米晶体技术在难溶性药物中的应用进展与思考 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2016, 18(10): 1788-1793.
- [15] 干婷婷, 江昌照, 陈杭, 等. 微囊在口服药物制剂中的应用研究进展 [J]. 中国药学杂志, 2022, 57(11): 874-880.
- [16] 周伟成, 刘宇灵, 陈颖翀, 等. 去氢骆驼蓬碱包合物脂质体的制备及体外性质评价 [J]. 中草药, 2022, 53(24): 7696-7705.
- [17] Kong D H, Hong W Y, Yu M, *et al*. Multifunctional targeting liposomes of epirubicin plus resveratrol improved therapeutic effect on brain gliomas [J]. *Int J Nanomedicine*, 2022, 17: 1087-1110.
- [18] Wang X C, Parvathaneni V, Shukla S K, *et al*. Inhalable resveratrol-cyclodextrin complex loaded biodegradable nanoparticles for enhanced efficacy against non-small cell lung cancer [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 164: 638-650.
- [19] 李琼, 于维先. 白藜芦醇治疗牙周炎及其生物利用度的研究进展 [J]. 国际口腔医学杂志, 2023, 50(1): 25-31.
- [20] Haasbroek-Pheiffer A, van Niekerk S, van der Kooy F, *et al*. *In vitro* and *ex vivo* experimental models for evaluation of intranasal systemic drug delivery as well as direct nose-to-brain drug delivery [J]. *Biopharm Drug Dispos*, 2023, 44(1): 94-112.
- [21] 陈颖翀, 李翔, 张婧, 等. 硫酸长春新碱脂质体含量测定及 3 种包封率测定方法的比较 [J]. 中国药房, 2014, 25(37): 3504-3507.
- [22] 刘万路. 牛血清白蛋白/壳聚糖双层包覆染料木素脂质体的制备、表征和口服药动力学研究 [J]. 中草药, 2023, 54(24): 8018-8030.
- [23] 杨云嵌, 于佳岐, 胡雪, 等. 白藜芦醇胶束的制备及初步质量评价 [J]. 中国药师, 2022, 25(11): 2032-2037.
- [24] Zou J Y. Site-specific delivery of cisplatin and paclitaxel mediated by liposomes: A promising approach in cancer chemotherapy [J]. *Environ Res*, 2023, 238(Pt 1): 117111.
- [25] Chen Y C, Liu Y L, Xie J, *et al*. Nose-to-brain delivery by nanosuspensions-Based *in situ* gel for breviscapine [J]. *Int J Nanomed*, 2020, 15: 10435-10451.
- [26] Emad N A, Ahmed B, Alhalmi A, *et al*. Recent progress in nanocarriers for direct nose to brain drug delivery [J]. *J Drug Deliv Sci Technol*, 2021, 64: 102642.
- [27] Jeong S H, Jang J H, Lee Y B. Drug delivery to the brain via the nasal route of administration: Exploration of key targets and major consideration factors [J]. *J Pharm Investig*, 2023, 53(1): 119-152.

[责任编辑 郑礼胜]