

白藜芦醇口服自微乳在大鼠体内药代动力学的研究

王敏¹, 林茂¹, 高仕琴¹, 罗荣英¹, 王吉博¹, 王春梅¹, 倪南珍² (1. 遵义医学院珠海校区, 广东珠海 519041; 2. 珠海市金湾区妇幼保健院, 广东珠海 519040)

摘要: 目的 观察白藜芦醇口服自微乳在大鼠体内药代动力学过程。方法 SD大鼠分别给予50 mg/kg白藜芦醇口服自微乳或混悬液灌胃, 用HPLC法测定血浆白藜芦醇含量, DAS 2.1.1软件计算药动学参数。结果 血浆白藜芦醇浓度在(10~5 000) $\mu\text{g/L}$ 线性关系良好($r=0.996$), 白藜芦醇提取回收率为83.28%~86.15%。白藜芦醇口服自微乳、混悬液的药动学过程均符合二室模型, 权重因子为1。与混悬液比较, 白藜芦醇口服自微乳的血浆峰浓度增加、平均滞留时间延长、曲线下面积增大($P<0.05$), 相对生物利用度为131.84%。结论 口服自微乳可促进白藜芦醇吸收, 提高生物利用度。

关键词: 白藜芦醇; 自微乳; 药动学; 生物利用度

中图分类号: R 943

文献标识码: A

文章编号: 2096-3610(2017)04-0362-05

Pharmacokinetic evaluation of resveratrol oral self-microemulsion in rats

WANG Min¹, LIN Mao¹, GAO Shi-qin¹, LUO Rong-ying¹, WANG Ji-bo¹, WANG Chun-mei¹, NI Nan-zhen²

(1. Zhuhai Campus of Zunyi Medical College, Zhuhai 519041, China; 2. Jinwan District Maternal and Children Health Hospital, Zhuhai 519040, China)

Abstract: Objective To study the pharmacokinetics of resveratrol (Res) oral self-microemulsion in rats. Methods SD rats were administered intragastrically with 50 mg/kg Res oral self-microemulsion or suspension. Plasma Res concentrations were determined by HPLC, and pharmacokinetic parameters were calculated by DAS ver 2.1.1. Results There was a good linear correlation ($r=0.996$) when plasma Res contents were 10 to 5 000 $\mu\text{g/L}$. The extraction recovery of Res was 83.28% to 86.15%. The pharmacokinetic process of Res oral self-microemulsion and suspension accorded with two-compartment model, with the weighting factor of 1. Compared with Res suspension, the peak plasma concentration, mean residence time, and area under curve of Res oral self-microemulsion were increased ($P<0.05$). The relative bioavailability was 131.84%. Conclusion The oral self-microemulsion promotes the absorption and improves the bioavailability of Res.

Key words: resveratrol; self-microemulsion; pharmacokinetics; bioavailability

白藜芦醇(resveratrol, Res)为多羟基芪类化合物, 主要存在于葡萄、花生及中药虎杖等植物中, 是一种植物类抗毒素。研究发现, Res具有抗炎、抗癌、抗氧化、抗心血管疾病、免疫调节等的药理作用^[1-2], 且是一种较具潜力的抗癌药物^[3-4], 但因水溶性差、口服生物利用度低、代谢快、易氧化降解等理化性质限制了其在临床的应用^[5-6]。鉴于此, 可选择合适的纳米给药系统, 提高白藜芦醇的溶解度,

延缓其体内释放速度, 进而达到改善其生物利用度的效果。自微乳化药物传递系统(self-microemulsifying drug delivery system, SMEDDS)是由药物、油相、表面活性剂、助表面活性剂组成, 在体温环境下, 遇液体后可在胃肠蠕动的作用下自发地形成水包油型乳剂, 由于体系的巨大比表面积, 故提高了水不溶性药物的溶出和生物利用度, 可解决微乳存放的稳定性, 避免不稳定药物的水解及对胃肠道刺激等问题^[7-8]。Res自微乳的制备、Res自微乳软胶囊的研究以及Res在小鼠血浆中药代动力学的研究国内都曾报道^[9-10], 但Res自微乳在大鼠体内药代动力学的研究较为鲜见。因此, 本研究通过对Res口服自微乳与Res混悬液比较, 观察两者在大鼠体内的药动学参数和生物利用度, 旨在继续研究Res更高效的制剂提供实验依据。

基金项目: 广东省卫生厅项目(No.A2013651), 珠海市卫生局项目(No.2014101)

收稿日期: 2017-04-19; **修订日期:** 2017-06-20

作者简介: 王敏(1982-), 女, 硕士, 副教授

通信作者: 倪南珍, 女, 副主任, E-mail: 94718191@qq.com。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SD大鼠12只,SPF级,雌雄各半,体质量(180~220)g,购于广东省实验动物中心,许可证号:SCXK(粤)2013-0002。

1.2 试剂、药品与仪器

Res(武汉圣天宇科技有限公司,批号:20121220,纯度>98%)、甲醇(色谱级,Merck公司)、乙酸乙酯、三乙酸甘油酯、丙二醇、吐温80(分析纯,均购买于天津化学试剂有限公司)、交联羧甲基纤维素钠(CMC-Na)SD-711(分析纯,上海昌为医药辅料技术有限公司)、屈臣氏蒸馏水、纯氮(珠海大林湾工业气体有限公司)、XP2U十万分之一电子天平(梅特勒)、SPD-16高效液相色谱仪(日本岛津)、TGL-16B高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂)、XW-80A旋涡混合器(上海医科仪器厂)、YGC-12氮吹仪(郑州宝晶电子科技有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 色谱条件 色谱柱C₁₈(4.6×250 mm,粒径5 μm),流动相甲醇:水50:50,检测波长306 nm,流速0.8 mL/min,进样量20 μL,柱温25℃。

1.3.2 Res口服自微乳的制备 按处方比例精密称取Res 0.750 g,三乙酸甘油酯(油相)0.750 g,丙二醇(乳化剂)0.250 g,吐温80(乳化剂)0.500 g。首先将Res与油相混合再加入表面活性剂和助表面活性剂,混合均匀即可。

1.3.3 Res混悬液的制备 按处方比例精密称取Res 0.750 g,CMC-Na 0.500 g,加入蒸馏水100 mL使Res均匀分散即可。

1.3.4 血浆样品的处理 精密量取100 μL大鼠血浆至预先用肝素处理好的EP管中,加入乙酸乙酯500 μL,涡旋提取1 min,于4 000 r/min离心10 min,将上清液吸出。重复上述方法再提取一次后,合并上清液后,氮气吹干。最后加入100 μL甲醇涡旋混匀,13 025 g离心10 min,提取上清,按确定的色谱条件进样检测。

1.3.5 血浆样品分析方法的建立 (1)方法专属性测定:取空白血浆、含Res血浆和Res自微乳灌胃1 h后血浆,处理后进样检测。(2)标准曲线的制备:精密量取大鼠空白血浆100 μL,加入不同质量浓度的Res甲醇溶液15 μL,使血浆中Res质量浓度分别为10、20、100、3 200、4 000、5 000 μg/L,处理后检测。以Res质量浓度为横坐标 x ,峰面积为纵坐标 y ,绘制

标准曲线。(3)精密度试验:配制低、中、高3种浓度(20、2 000、5 000 μg/L)的Res血浆标准品溶液,处理后分别于1 d内测定5次计算日内精密度,5 d内测定5次计算日间精密度。(4)稳定性试验 配制低、中、高3种浓度(20、2 000、5 000 μg/L)Res血浆样品,处理后,考察样品在-20℃放置24 h,再置室温8 h,按确定的色谱条件进样检测。(5)提取回收率试验 配制低、中、高3种浓度(20、2 000、5 000 μg/L)的Res血浆标准品溶液,处理后检测。依据标准曲线计算各自的浓度,得到低、中、高3种浓度的提取回收率。

1.3.6 药代动力学测定 (1)药时曲线的绘制:取清洁级大鼠12只,随机分为两个实验组,每组6只。一组用Res口服自微乳灌胃,另一组用Res混悬液灌胃,给药量为50 mg/kg。在灌胃前先用10%的水合氯醛按3 mL/kg腹腔注射,进行麻醉大鼠。给药后分别在10、20、30、45 min以及1、2、4、6、8 h对每只大鼠进行眼眶静脉采血,全血于3 500 r/min离心10 min,取上清血浆液,处理后检测,以血药浓度对时间绘制药时曲线。(2)药动学参数的计算 将测得的Res口服自微乳与Res混悬液的血药浓度-时间数据,采用DAS 2.1.1版统计软件对药动学数据进行拟合,并计算药动学参数。

1.4 统计学处理

采用SPSS 18.0统计学软件统计分析,药动学参数以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 方法专属性

如图1所示。结果表明,在该色谱条件下,空白血浆不干扰Res的测定,且Res的保留时间为8.1 min左右,该检测方法可行。

2.2 标准曲线的制备

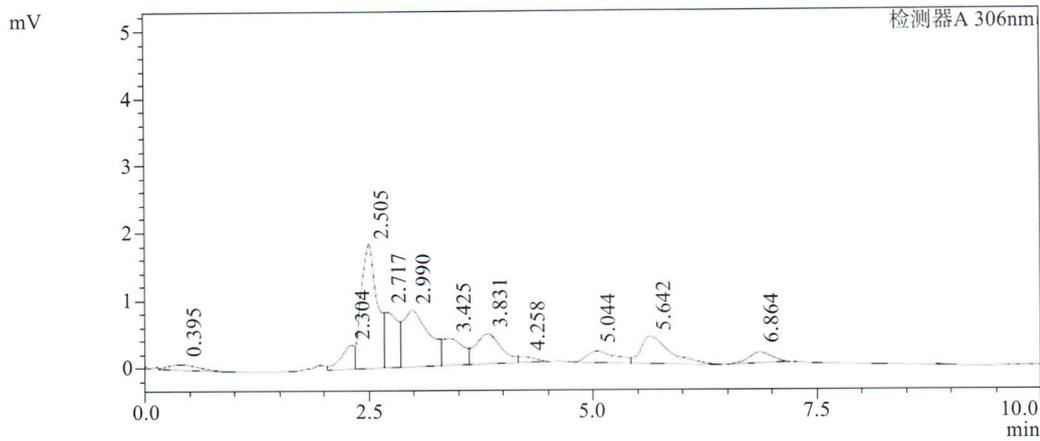
标准曲线方程为 $y = 35.23x + 32\ 510$,相关系数 $r = 0.996$,结果表明Res浓度在10~5 000 μg/L范围内的线性关系良好。考察Res血浆样品的最低定量限为5 μg/L。

2.3 精密度试验

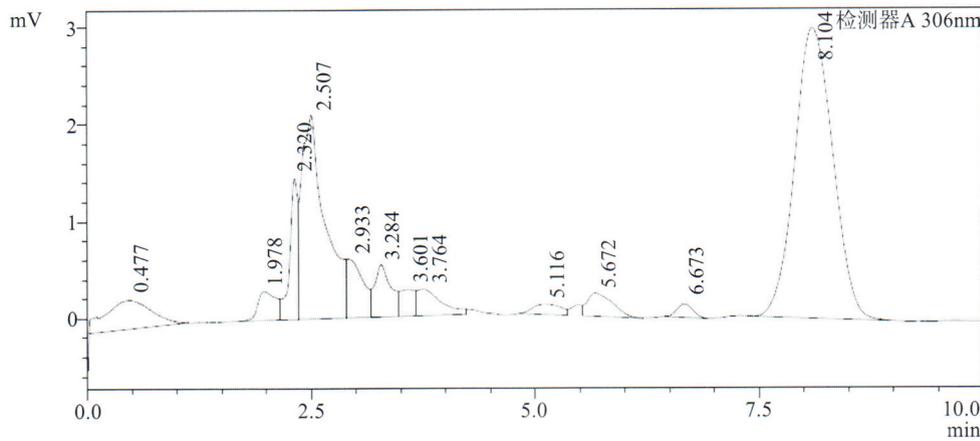
日内精密度及日间精密度结果见表1,表明精密度符合方法学要求。

2.4 稳定性试验

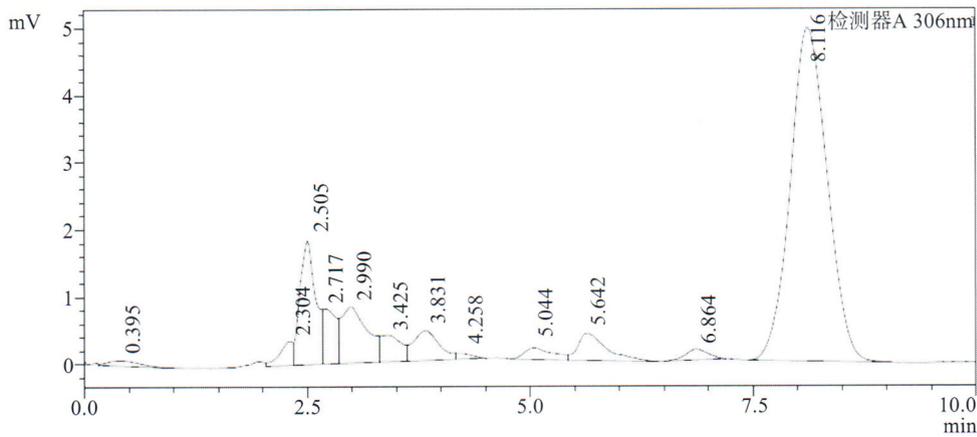
结果见表2,表明Res血浆样品稳定性良好。



A



B



C

A: 空白血浆色谱图(8.1 min无色谱峰); B: 含Res血浆色谱图(8.1 min处的色谱峰为Res); C: 大鼠灌胃1 h后血浆色谱图(8.1 min处的色谱峰为Res)

图1 方法专属性色谱图

表1 Res大鼠血浆样品的日内及日间精密度 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

理论值/ $(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	日内			日间		
	测得值/ $(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	回收率/%	RSD/%	测得值/ $(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	回收率/%	RSD/%
20	19.10±0.99	95.51	5.18	19.05±0.92	95.24	4.82
2 000	1 929.59±60.53	96.48	3.14	1 948.62±52.07	97.43	2.67
5 000	4 825.62±165.00	96.51	3.42	4 834.28±102.82	96.69	2.13

2.5 提取回收率试验

结果见表3, 表明提取回收率均在80%以上, 且

RSD<10%, 满足测定要求。

2.6 药时曲线的绘制

表2 Res大鼠血浆样品的稳定性结果 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

理论值/($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	测得值/($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	回收率/%	RSD/%
20	19.46 \pm 0.82	97.32	4.21
2 000	1 899.44 \pm 76.60	94.97	4.03
5 000	4 757.89 \pm 271.86	95.16	5.71

表3 Res大鼠血浆样品的提取回收率 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

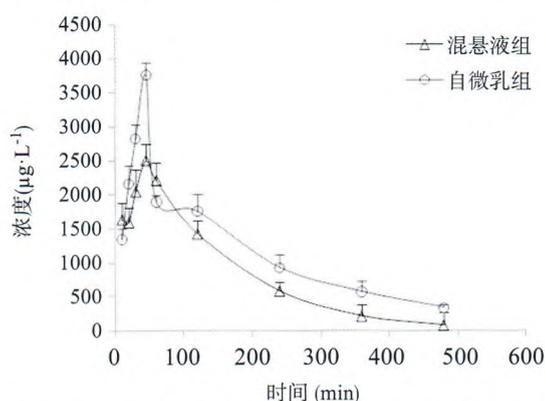
理论值/($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	测得值/($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	回收率/%	RSD/%
20	16.75 \pm 1.40	83.75	8.38
2 000	1 665.55 \pm 108.16	83.28	6.49
5 000	4 307.74 \pm 364.62	86.15	8.46

表4 Res混悬液和Res自微乳给药后的主要药动学参数

参数	参数值($\bar{x} \pm s$, $n=6$)	
	Res口服自微乳组	Res混悬液组
$t_{1/2z}/\text{min}$	156.05 \pm 25.09 ^a	107.47 \pm 33.53
$t_{1/2\beta}/\text{min}$	184.21 \pm 10.04 ^a	144.76 \pm 7.06
$T_{\text{max}}/\text{min}$	43.67 \pm 1.21 ^a	54.67 \pm 5.54
$C_{\text{max}}/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	3.76 \pm 0.19 ^a	3.07 \pm 0.26
$\text{AUC}(0\sim t)/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1})$	562.14 \pm 108.52 ^a	424.94 \pm 84.69
$\text{AUC}(0\sim\infty)/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1})$	642.46 \pm 138.68 ^a	462.49 \pm 106.58
$\text{MRT}(0\sim\infty)/\text{min}$	223.82 \pm 34.26 ^a	156.52 \pm 37.55

与Res混悬液比较: ^a $P<0.05$ 。

以血药浓度对时间绘制药时曲线,如图2所示,Res自微乳组与Res混悬液组相比,Res在大鼠体内的吸收速度及程度均增加。

图2 Res混悬液与Res自微乳给药后的药时曲线 ($n=6$)

2.7 药动学参数的计算

结果见表4。房室拟合结果为Res口服自微乳组与混悬液组均为二室模型,权重系数为1。Res混悬液的消除半衰期($t_{1/2\beta}$)是口服自微乳的1.27倍($P<0.05$),说明灌胃后Res混悬液组中的Res消除速率大于口服自微乳组;而Res口服自微乳在大鼠血浆峰浓度(C_{max})、药时曲线下面积[AUC(0~t)]、体内平均滞留时间[MRT(0~∞)]分别是同等剂量Res混悬剂的1.22倍、1.32倍和1.43倍,差异均有统计学意义($P<0.05$)。根据公式,相对生物利用度 $F(\%)=[\text{AUC}(0\sim\infty)(\text{自微乳组})/\text{AUC}(0\sim\infty)(\text{混悬剂组})]\times 100\%$ 计算,得Res口服自微乳的相对生物利用度为131.84%,表明与Res混悬剂相比,Res口服自微乳可提高药物的口服生物利用度。

3 讨论

本实验采用HPLC法进行血浆Res的含量测定,

在提取溶剂的选择中,分别比较乙酸乙酯和甲醇的提取回收率,其中甲醇的提取回收率较低,为43.12%,而用乙酸乙酯的提取回收率较高为80%以上,且在2 h左右即可用氮气挥干。所以本实验选择用乙酸乙酯作为沉降蛋白并提取药物的溶剂。

药动学结果表明,Res口服自微乳与Res混悬液在大鼠体内的药动学过程均符合二室模型。亦有文献报道^[11],口服Res后,经水解的代谢产物会通过肝肠循环而再次被吸收利用,显示Res在人体体内药代过程为二室模型,这与本实验结果一致。Res口服自微乳在大鼠体内的血浆峰浓度(C_{max})、药时曲线下面积[AUC(0~t)]、体内半衰期($t_{1/2z}$)和体内平均滞留时间(MRT)分别是同等剂量Res混悬液的1.22倍($P<0.05$)、1.32倍($P<0.05$)、1.45倍($P<0.05$)和1.43倍($P<0.05$),且Res口服自微乳与Res混悬液比较的相对生物利用度为131.84%。该结果说明口服自微乳可以使得Res在大鼠血浆中的平均滞留时间延长,并提高生物利用度,可见,自微乳可成为Res良好的给药载体。分析原因,一方面自微乳经口服后,经胃的蠕动及与胃液的接触可自发形成微乳,此时,大部分药物以分子形式存在,即提高了Res在水中的溶解度,使得溶出速度加快;另一方面,由于形成的微乳粒径较小,所以使得药物与胃肠壁接触的比表面积增大,且小粒子更易于透过胃肠壁的水化层,可增加胃肠道上皮细胞膜的通透性^[12],进而促进药物的胃肠道吸收,提高了药物的溶出程度。而且,Res在微乳粒子中以分子形式存在于吐温-80与丙二醇形成的高分子油水界面膜内,有利于提高稳定性^[13],经灌胃后药物需要先经油相经过乳化膜再释放到水相,经胃肠吸收后缓慢进入血液循环中,从而降低药物释放速率,延长药物在体内的半衰期,以及延长药物在体内的平均滞留时间,起到缓释的作用。另外,

自微乳在胃肠道吸收后还能经淋巴系统转运,可以避免肝首过效应。综上分析,SMEDDS可以提高口服Res的生物利用度,为开发Res新剂型提供依据。

参考文献:

- [1] 倪南珍,王敏,林茂,等.白藜芦醇对阿尔茨海默病小鼠记忆能力及脑组织NOS和NO含量的影响[J].遵义医学院学报,2014,37(1):99-102.
- [2] Park E J, Pezzuto J M. The pharmacology of resveratrol in animals and humans[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2015, 1852(6): 1071-1113.
- [3] Singh G, Pai R S. Dawn of antioxidants and immune modulators to stop HIV-progression and boost the immune system in HIV/AIDS patients: An updated comprehensive and critical review[J]. *Pharmacol Rep*, 2015, 67(3): 600-605.
- [4] 李金凤,高明月,王慧敏,等.载白藜芦醇泊洛沙姆403/407混合胶束的制备及其体外性质[J].药科学报,2015,50(8):1045-1051.
- [5] Malhotra A, Bath S, Elbarbry F. An Organ System Approach to Explore the Antioxidative, Anti-Inflammatory, and Cytoprotective Actions of Resveratrol[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2015, 2015: 1-15.
- [6] 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 Surf B Biointerfaces*, 2016, 148: 650-656.
- [7] Sapra B, Thatai P, Bhandari S, et al. A critical appraisal of microemulsions for drug delivery: part II [J]. *Ther Deliv*, 2014, 5(1): 83-94.
- [8] Mundada V, Patel M, Sawant K. Submicron Emulsions and Their Applications in Oral Delivery[J]. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 2016, 33(3): 265-308.
- [9] 蒋燕,陆继好,陈建伟.白藜芦醇自微乳软胶囊的制备及粒度测定[J].中医药导报,2012,18(8):80-82.
- [10] 吴莹,周庆,李杏,等.蓝莓花青素与白藜芦醇复配对老龄小鼠抗衰老作用的评价[J].中国医院药学杂志,2016,36(24):2178-2183.
- [11] 王丽丽,舒晓宏,李宏,等.白藜芦醇在人体内生物利用度的研究进展[J].大连医科大学学报,2014,36(6):592-596.
- [12] 卢秀霞,何琳,李敏媛,等.盐酸雷洛昔芬自微乳在大鼠体内的药动学评价[J].中国新药杂志,2015,24(8):936-941.
- [13] Duan X, Li M, Ma H, et al. Physicochemical properties and antioxidant potential of phosvitin-resveratrol complexes in emulsion system[J]. *Food Chem*, 2016, 206: 102-109.

(上接第361页)

TEM型 $\gamma\delta$ T细胞的升高应该是机体对于结核杆菌的免疫反应与病情发展紧密相关。

综上所述, $\gamma\delta$ T细胞比例和记忆表型的变化是机体对结核分枝杆菌免疫反应的表现,与肺结核发展紧密相关。当肺结核处于机体免疫功能活跃高峰期时, $\gamma\delta$ T细胞比例升高,经过3个月治疗后病情缓解, $\gamma\delta$ T细胞则下降至正常水平。同时,机体抗结核免疫功能活跃时, $\gamma\delta$ T细胞由TCM型转化为TEM型,增强机体免疫反应。 $\gamma\delta$ T细胞比例和记忆表型变化与肺结核的发病程度和疾病转归有关。因此,监测结核患者治疗前后外周血 $\gamma\delta$ T细胞比例的变化对于掌握活动性肺结核的发展和预后有重要的意义。

参考文献:

- [1] WHO. WHO global tuberculosis control report 2010[J]. *Cent Eur J Public Health*, 2010, 18(4):237.
- [2] 蔡智群,刘苏东,林兆原,等.耐药肺结核患者抑郁状况分析[J].广州医科大学学报,2015,43(6):47-48.
- [3] 全国第五次结核病流行病学抽样调查技术指导组.2010年全国第五次结核病流行病学抽样调查报告[J].中国防痨杂志,2012,34(8):485-508.
- [4] 黄松熙.73例抗结核药物致药物性肝炎的临床分析[J].广州医科大学学报,2015,43(2):74-75.
- [5] Abate G, Hoft D F. Immunotherapy for tuberculosis: future prospects[J]. *Immunotargets Ther*, 2016, 20(5): 37-45.
- [6] Boom W H. Gammadelta T cells and mycobacterium tuberculosis[J]. *Microbes Infect*, 1999, 1(3): 187-195.
- [7] Kabelitz D, He W. The multifunctionality of human Vgamma9Vdelta2 gammadelta T cells: clonal plasticity or distinct subsets?[J]. *Scand J Immunol*, 2012, 76(3): 213-222.
- [8] 中华医学会结核病学分会.肺结核诊断和治疗指南[J].中华结核和呼吸杂志,2001,24(2):70-74.
- [9] Chen Z W. Immune regulation of gammadelta T cell responses in mycobacterial infections[J]. *Clin Immunol*, 2005, 116(3): 202-207.
- [10] Bonneville M, O'Brien R L, Born W K. Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity[J]. *Nature reviews Immunology*, 2010, 10(7): 467-478.