

白藜芦醇纳米乳的制备及其功能评价



王顺丰, 王假尧, 于佳岐, 冯世权, 董德峤, 李定国, 胡雪, 曹俊艳, 何溶, 高亚男

海南医学院药学院热带药物创新与转化教育部工程研究中心, 人机智能协同肿瘤精准诊疗国际联合研究中心, 海南省热带药用植物研究开发重点实验室(海口 571199)

【摘要】目的 本研究通过纳米技术提高难溶性药物白藜芦醇的成药性, 进行了白藜芦醇纳米乳 (RES-NE) 的处方设计, 对其进行初步质量评价, 并研究了其预防紫外线引起的皮肤损伤作用。**方法** 考察白藜芦醇在不同辅料中的溶解度, 通过绘制三元相图, 确定与之配伍辅料的比例, 制备白藜芦醇纳米乳; 对所制备的白藜芦醇纳米乳进行粒径、Zeta 电位、形态等理化性质的表征; 采用紫外线照射方法考察白藜芦醇纳米乳对大鼠背部皮肤的保护作用。**结果** 根据溶解度及三元相图, 确定三乙酸甘油酯为油相, 聚氧乙烯蓖麻油 EL-60 为乳化剂, 聚乙二醇 400 为助乳化剂, 白藜芦醇纳米乳的最优处方为药物、油相、乳化剂、助乳化剂的质量比为 0.175 : 1.4 : 2.0 : 0.6, 超纯水定容至 25 mL; 所制备纳米乳的粒径为 (21.68 ± 3.89) nm, 多分散系数为 0.110 ± 0.010 , Zeta 电位为 (0.509 ± 0.145) mV, 紫外照射对照组出现大面积红斑, 用药组未出现或出现极小面积红斑。**结论** 制备的白藜芦醇纳米乳制剂外观澄明、性质安全且稳定、制备工艺简单、载药量高、具有一定的缓释作用, 初步认为白藜芦醇具有预防紫外线致皮肤损伤的潜能, 有望应用于皮肤护理、紫外线防护等领域。

【关键词】 白藜芦醇; 纳米乳; 质量评价; 抗紫外; 抗氧化; 酪氨酸酶抑制; 皮肤刺激性; 体外释放

【中图分类号】 R283.6

【文献标识码】 A

Preparation and functional evaluation of resveratrol nanoemulsion

WANG Shunfeng, WANG Jiayao, YU Jiaqi, FENG Shiquan, DONG Deqiao, LI Dingguo, HU Xue, CAO Junyan, HE Rong, GAO Yanan

Tropical Medicine Innovation and Transformation Engineering Research Center of Ministry of Education, International Joint Research Center of Human-Machine Intelligence Collaborative Tumor Precision Diagnosis, Hainan Key Laboratory of Tropical Medicinal Plant Research and Development, College of Pharmacy, Hainan Medical College, Haikou 571199, China

Corresponding author: GAO Yanan, Email: gao_yanan@hainmc.edu.cn

【Abstract】Objective To improve the drug properties of insoluble drug resveratrol through nanotechnology, carry out the prescription design of resveratrol nanoemulsion (RES-NE), preliminarily evaluate the quality evaluation, and study its effect on preventing skin damage caused by ultraviolet rays. **Methods** The solubility of resveratrol in different excipients was investigated, and the proportion of auxiliary materials was determined by drawing ternary phase diagrams to prepare resveratrol nanoemulsions. The physicochemical properties such as particle size, Zeta

DOI: 10.12173/j.issn.2097-4922.202404087

基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金项目(82060642); 海南省自然科学基金高层次人才项目(821RC569); 2022 年海南医学院校级创新科研项目(HYYB2022A03)

通信作者: 高亚男, 副教授, Email: gao_yanan@hainmc.edu.cn

potential, and morphology of resveratrol nanoemulsion were characterized. The protective effect of resveratrol nanoemulsion on the back skin of rats was investigated by ultraviolet irradiation. **Results** According to the solubility and ternary phase diagram, it was determined that glyceryl triacetate was the oil phase, polyoxyethylene castor oil EL-60 was emulsifier, polyethylene glycol 400 was used as co-emulsifier, the optimal formulation of resveratrol nanoemulsion was the drug, oil phase, emulsifier and co-emulsifier, with the mass ratio of 0.175 : 1.4 : 2.0 : 0.6, and the volume of ultrapure water was 25 mL. The particle size of the prepared nanoemulsion was (21.68 ± 3.89) nm, the polydispersity index was 0.110 ± 0.010 , and the Zeta potential was (0.509 ± 0.145) mV. Large areas of erythema appeared in the ultraviolet radiation control group, and no or very small areas of erythema appeared in the medication group. **Conclusion** The prepared resveratrol nanoemulsion preparation has clear appearance, safe and stable nature, simple preparation process, high drug load, and certain slow-release effect. It is preliminarily believed that resveratrol has the potential to prevent skin damage caused by ultraviolet rays, and is expected to be used in skin care, ultraviolet protection and other fields.

【Keywords】 Resveratrol; Nanoemulsion; Quality evaluation; UV resistant; Antioxidation; Tyrosinase inhibition; Skin irritation; *In vitro* release

紫外线照射 (ultraviolet, UV) 在人们日常生活中不可避免, 适度的 UV 照射有利于机体钙成分的合成, 但过度的 UV 照射可引起多种皮肤病变甚至诱发癌症。UV 照射对正常皮肤的主要急性影响包括晒伤炎症 (红斑)、晒黑和局部或全身免疫抑制等^[1]。长时间暴露于 UV 下不仅会导致皮肤皱纹、红肿、粗糙和色素沉着, 而且有进一步诱发皮肤癌的风险^[2]。

一些天然药物能有效预防 UV 照射给皮肤带来的损伤。白藜芦醇 (resveratrol, RES) 是一种天然的多酚类化合物 (结构式见图 1), 其能够有效对抗外界的感染、刺激、UV 辐射等, 并且具有多重药理活性, 如抗炎、抗氧化、抗衰老、抗癌、抗肿瘤、促进伤口愈合、调控血糖、保护心脑血管、调节胆固醇、解热止痛等^[3-7]。但 RES 遇光易氧化分解, 其稳定性差, 难溶于水, 在体内生物利用度低^[8], 在临床中的应用受到较大限制。采用现代制剂手段纳米乳 (nanoemulsion, NE) 不仅可保留 RES 的优势, 而且能显著改善其缺陷。NE 是一种各向同性、略带乳光的胶体分散体系, 其热力学和动力学均稳定, 且乳滴大小均匀, 呈球状, 外观透明, 在结构上可分为油包水 (W/O) 型、水包油 (O/W) 型等, 给药方式有口服给药、注射给药、经皮给药、黏膜给药等。NE 由乳化剂稳定的纳米级液滴组成, 与传统乳剂相比, 粒径更小、表面积更大、渗透性更强^[9]。更重要的是, NE 制备工艺简单、增溶效果好、缓释等优点, 能有效提高疏水性药物的生

物利用度^[10-11]。例如, Pacheco 等^[12]利用高能乳化法开发了一种新型 NE, 该花檀油包封配方稳定且易于制备, 并降低了长波 UV (UVA) 诱导的促炎细胞因子白细胞介素 (interleukin, IL)-6 和 IL-8 的水平, 可以有效预防和治疗 UVA 诱导的应激, 有助于降低 UV 辐射对皮肤老化的影响。此外, Yousry 等^[13]通过 D- 优化混合设计开发和优化胶原水 NE (W/O 型 NE), 将具有良好抗氧化性能的维生素 E 作为配方的组成部分, 并通过小鼠 UV 照射实验证实该 NE 可有效减少 UV 辐射的破坏性影响。同样的, Arianto 等^[14]通过向 NE 中加入多个含有活性成分的药物, 以达到协同增强防晒的目的。经过反复筛选优化, 最终选用了含 3% 丙芳苯酮、7.5% 甲氧基肉桂酸辛酯、2.73% 大豆油和 0.27% 液体石蜡的处方。大豆油具有可以吸收 UVB 射线的特性, 而 NE 液技术的应用也提高了亲脂性物质 (丙芳苯酮) 的溶解度, 使制剂具有较小的球状尺寸。通过动物实验证明了其具有更加良好的抗 UV 效果。

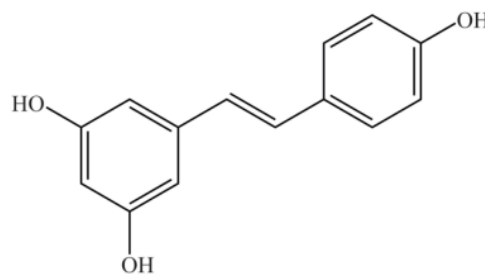


图1 反式RES结构式

Figure 1. Structural formula of trans-RES

总的来说,目前基于 RES 的抗 UV 产品、W/O 型 NE 存在产品油腻、不易洗除等缺点,因此 O/W 型 NE 的开发为解决这些问题提供了思路,并解决 RES 生物利用度低等潜在问题。本研究将利用对 RES 溶解度大且配伍性良好的辅料,筛选并优化制剂处方,通过微射流高压均质技术,获得载药量大、性质稳定、抗氧化能力强的 RES-NE,并考察其皮肤刺激性和抗 UV 能力。

1 材料与方法

1.1 主要仪器

Ultimate3000 高效液相色谱仪(美国赛默飞世尔公司);ME104/02 电子天平(上海梅特勒-托利多仪器股份有限公司);T6 紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器股份有限公司);KQ5200DE 超声波清洗机(昆山市超声仪器股份有限公司);DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器(上海力辰邦西仪器股份有限公司);ZD-85* 数显气浴恒温振荡器(金坛市康华电子仪器制造厂);雷磁 PHSJ-3F 实验室 pH 计(上海仪电科学仪器股份有限公司);UVS-2000-450 紫外线照射装置(广州 LONGPRO 朗普科技);Spectra Max190 型全波长酶标仪(上海美谷分子仪器公司);HY-4 型调速多用振荡器(金坛市晶玻实验仪器厂);NanoGenizer30k/ 高压微射流均质机(苏州微流纳米生物技术有限公司)。

1.2 主要药品与试剂

RES(批号:RH219958,纯度 99%)、聚乙二醇 400(PEG400,批号:RH171674)购自上海罗恩试剂;聚氧乙烯蓖麻油 EL-10(批号:Y12010S99752)、聚氧乙烯蓖麻油 EL-20(批号:Y20J11S119087)、聚氧乙烯蓖麻油 EL-35(批号:H09J12A136910)、聚氧乙烯蓖麻油 EL-40(批号:H24N11A132113)、聚氧乙烯蓖麻油 EL-60(批号:Y06J12S136876)、聚氧乙烯蓖麻油 EL-80(批号:Y22A11S111715)、聚氧乙烯氢化蓖麻油 EL-40(批号:Y22D9S78217)、聚氧乙烯氢化蓖麻油 CO-40(批号:Y08J12S136907)、Labrafac lipophile WL 1349(批号:S25953)、聚氧乙烯氢化蓖麻油 CO-60(批号:Y08J12Y136906)、蓖麻油(批号:Z24O11Y128870)、丙二醇单月桂酸酯(Lauroglycol 90,批号:177063)、聚氧乙烯氢化蓖麻油 RH60(批号:S23141)购自上海源叶生物技术有限公司;

三乙酸甘油酯(批号:R7NRE5QR)、肉豆蔻酸异丙酯(批号:DRR5EEN2)、二乙二醇单乙基醚醋酸酯(diethylene glycol monoethyl ether acetate, DGMEA,批号:AG310001)、1,2-丙二醇(批号:EH030014)、1,3-丁二醇(批号:FA120155)购自安徽安耐吉化学;蓖麻油聚氧酯 35(kolliphor ELP,批号:64510688Q0)、聚氧乙烯化的 12-羟基硬脂酸(kolliphor HS15,批号:64510688Q0)、聚氧乙烯 40 氢化蓖麻油(kolliphor RH40,批号:12566375L0)购自北京凤礼精求医药股份有限公司;油酸乙酯(批号:TCL O0054)、吐温 80(批号:MFC00082107)购自日本东京化成工业株式会社;过硫酸钠(批号:DU3RRE7Q,纯度>99%)、2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸(ABTS,批号:GC070141,纯度>98%)购自上海萨恩化学技术有限公司;L-酪氨酸(批号:12352209)、酪氨酸酶(批号:12352204)购自上海 Sigma 公司;茶油(福建春辉生物工程有限公司,批号:117652018);甘油(广东光华科技股份有限公司,批号:ZL200430086234.X);1,1-二苯基-2-苦基肼(DPPH)自由基(上海梯希爱化成工业发展有限公司,批号:464RB-GE);油酰聚氧乙烯甘油酯(Labrafil M1944CS,嘉法狮股份有限公司,批号:146917);无水乙醇(西陇科学股份有限公司,批号:220625);苏木精-伊红(HE)染色液(武汉塞维尔股份有限公司,批号:G1076);甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

1.3 动物

昆明小鼠,雄性,FBS 级,体重(20 ± 2)g,由湖南省斯莱克景达实验动物有限公司,动物质量合格证号:SCXK(湘)2021-0002。SD 大鼠,雄性,FBS 级,体重(200 ± 10)g,由长沙市天勤生物技术有限公司提供,动物质量合格证号:SCXK(湘)2019-0014。动物给予充足饮食及饮水,饲养在温度 25℃和湿度 50%~55%中,12 h 的光暗循环。本研究经海南医院实验动物伦理委员会批准(伦理批件号:HYLL-2021-150)。

1.4 方法

1.4.1 处方组成的初步筛选

①油相筛选。分别取 Labrafac lipophile WL 1349(中链甘油三酯、WL 1349)、茶油、蓖麻油、三乙酸甘油酯、肉豆蔻酸异丙酯和油酸乙酯等油

脂各 2.0 g 置于西林瓶中, 分别加入过量 RES, 封口后置于恒温振荡器中在 37 ℃ 下恒温振荡 72 h; 通过 0.22 μm 的微孔滤膜过滤, 采用 HPLC 法测定 RES 在各油脂中的溶解度。

②乳化剂的筛选。分别取 kolliphor ELP、kolliphor HS15、kolliphor RH40、Labrafil M1944CS、吐温 80、聚氧乙烯蓖麻油 EL-10、EL-20、EL-35、EL-40、EL-60、EL-80、聚氧乙烯氢化蓖麻油 RH60、CO-40、CO-60 等 14 种乳化剂各 1.0 g, 分别加入过量 RES, 参照油相筛选项相同操作方法, 测定 RES 在各乳化剂中的溶解度。

③助乳化剂的筛选。分别取 Lauroglycol 90、PEG400、甘油、无水乙醇、二乙二醇单乙基醚醋酸酯、1,2-丙二醇、1,3-丁二醇等助乳化剂各 1.0 g, 分别加入过量 RES, 参照油相筛选项相同操作方法, 测定 RES 在各助乳化剂中的溶解度。

④绘制空白 NE 三元相图。据文献^[15-17]可知, 乳化剂添加范围为 30%~70%, 助乳化剂添加范围为 5%~25%, 与油相加和为 100%。将不同比例的处方完全混合后, 磁力搅拌至混合均匀, 每个样品用移液枪取 100 μL 滴加入 37 ℃、20 mL 的蒸馏水中, 观察乳化现象, 绘制三元相图, 确定最优处方。

⑤ RES-NE 的制备。称取 1.4 g 油相、2.0 g 乳化剂、0.6 g 助乳化剂, 加入 0.175 g RES, 以 800 r/min 磁力搅拌 15 min 至 RES 完全溶解, 加入 20 mL 超纯水, 继续以 800 r/min 磁力搅拌 10 min, 20.5 kPa 微射流高压均质 4 次, 制备成 RES-NE。

1.4.2 RES-NE 的药物含量和稳定性

①色谱条件。采用 HPLC 法测定 RES 的含量。色谱柱: SPOLAR C₁₈ 柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水 (42:58); 检测波长: 305 nm; 柱温: 35 ℃; 流速: 1.0 mL/min; 进样量: 10 μL。

②标准曲线的绘制。取 RES 0.01 g, 精密称定, 置于 10 mL 量瓶中, 加入 80% 甲醇振摇溶解后定容, 用 80% 甲醇稀释至浓度分别为 2.00、5.00、10.00、20.00、30.00、50.00 μg/mL 的标准溶液, 摇匀过滤后按上述色谱条件进行测定。以 RES 浓度 (X, μg/mL) 对峰面积 (Y) 作线性回归得标准曲线。

③ RES-NE 的药物含量测定。取 RES-NE 3 批, 分别稀释适当倍数, 用 80% 甲醇破乳, 按拟定色谱条件进样测定 RES-NE 的药物含量。

④稳定性试验。将 RES-NE 置于 4 ℃ 条件下, 分别于 1、3、5、7、10、20、30、45 d 观察外观变化, 并测定药物含量, 考察制剂的稳定性。

1.4.3 RES-NE 的形态学和粒径测定

取 RES-NE, 加水稀释适宜倍数, 超声 (功率: 160 W, 频率: 40 kHz) 5 min 使乳滴分布均匀, 滴加至覆有 Formvar 膜的铜网上, 等待 5 min 后, 用滤纸吸干多余液体, 用 2% 磷钨酸染色 3 min, 用滤纸吸干多余磷钨酸, 将铜网室温晾干后在透射电子显微镜下观察 NE 形态并测定粒径; 另取 RES-NE, 加水稀释适宜倍数, 采用激光纳米粒度分析仪测定其粒径、多分散系数和 Zeta 电位。

1.4.4 抗氧化实验

① DPPH 自由基抑制作用。配制浓度为 80 μg/mL 的 DPPH 甲醇溶液, 备用; 精密吸取 RES-NE 125 μL 置于 10 mL 量瓶中; 用甲醇定容; 精密吸取上述稀释后的 RES-NE 125 μL 置于 96 孔板中, 加入 DPPH 溶液 125 μL, 室温下避光振荡 30 min, 于 517 nm 处测定吸光度 (A), 结果记为 A_{sample}; 以甲醇代替 RES-NE 进行对照实验, 结果记为 A_{control}; 制备相同含药量的 RES 溶液 (溶剂为甲醇) 代替 RES-NE 进行参比试验, 结果记为 A_{reference}。DPPH 自由基清除率计算公式如下:

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}}\right) \times 100\% \quad \text{公式 1}$$

② ABTS 自由基抑制作用。配制含 ABTS (7 mmol/L) 和过硫酸钠 (2.45 mmol/L) 的水溶液, 室温下避光放置 24 h; 取适量混合溶液用甲醇稀释 30 倍, 使其在 734 nm 处的 A 值在 0.7~0.8 之间。将 3.84 μg/mL ABTS 水溶液与 0.029 6 g 过硫酸钠水溶液混合, 过夜放置 ABTS 溶液; 以甲醇为对照组, 将甲醇、稀释后的 RES-NE 溶液分别与 ABTS 溶液混合, 室温下避光振荡 30 min, 取溶液, 采用 UV 法于 734 nm 处测定样品 A 值, 样品清除率按公式 1 计算。

③羟自由基抑制作用。配置 0.01 mol/L 硫酸亚铁溶液、0.01 mol/L 乙醇水杨酸溶液和 0.05 mol/L 30% 双氧水溶液, 备用。按表 1 的比例将各溶液于西林瓶中混合, 室温下避光振荡 30 min, 精密吸取溶液 250 μL 于 96 孔板中, 采用 UV 法于波长

510 nm 处测定样品 A 值,样品清除率按公式 2 计算:

羟自由基清除率 (%) = $\left(1 - \frac{A_x - A_{x0}}{A_0}\right) \times 100\%$ 公式2

式中 A_0 为空白对照的 A 值; A_x 为加样品的 A 值; A_{x0} 为不加显色剂双氧水的 A 值。

表1 羟自由基抑制实验中各组分加样量 (mL)
Table 1. The amount of each component added in the hydroxyl radical inhibition experiment (mL)

试剂	A_0	A_x	A_{x0}
硫酸亚铁溶液	0.5	0.5	0.5
乙醇水杨酸溶液	0.5	0.5	0.5
RES-NE	0	7.5	7.5
超纯水	7.5	0	0.5
30%双氧水溶液	0.5	0.5	0
总量	9.0	9.0	9.0

1.4.5 酪氨酸酶抑制作用

将 25 000 U 酪氨酸酶溶液溶解于超纯水中,定容至 25 mL,获得 1 000 U/mL 的酪氨酸酶原液;精密称取 0.10 g L -酪氨酸溶于 35 mL 0.1 mol/L 的盐酸,再加入 65 mL pH 6.8 的磷酸缓冲溶液,配制成 0.05% L -酪氨酸溶液。

将稀释后的 RES-NE 与 L -酪氨酸溶液混合,37 ℃ 恒温水浴避光放置 15 min 后加入酪氨酸酶溶液,继续在 37 ℃ 恒温水浴中避光放置 45 min,以不加 RES-NE 的 L -酪氨酸与酪氨酸酶混合溶液为空白对照组,各组分加样量见表 2。精密吸取各溶液 250 μ L 于 96 孔板中,在 450 nm 处测定 A 值测定样品溶液,按公式 3 计算 RES-NE 对酪氨酸酶的抑制率。

酪氨酸酶抑制率 (%) = $\left(1 - \frac{A_x - A_{x0}}{A_0}\right) \times 100\%$ 公式3

式中 A_0 为空白对照的 A 值; A_x 为加样品的 A 值; A_{x0} 为不加酪氨酸酶溶液的 A 值。

表2 酪氨酸酶抑制实验中各组分加样量 (mL)
Table 2. The amount of each component added in the tyrosinase inhibition experiment (mL)

试剂	A_0	A_x	A_{x0}
L -酪氨酸溶液	0.50	0.50	0.50
酪氨酸酶溶液	0.25	0.25	0
RES-NE	0	0.75	0.75
磷酸缓冲溶液	1	0.25	0.50
总量	1.75	1.75	1.75

1.4.6 体外释放实验

配置 pH 5.8 磷酸盐缓冲液,加入 0.5% 吐温 80 构造漏槽条件,加入 0.2% 维生素 C 防止 RES 被氧化;称取 0.175 g RES 溶于水中制备 RES 混悬

液为对照组,分别取 2 mL RES 混悬液、RES-NE 装于透析袋中,两头封紧置于 pH 5.8 的磷酸盐缓冲液释放介质中,32 ℃ 下振荡 24 h;分别于 0.5、1、1.5、2、3、6、9、12、24 h 取释放介质并稀释,及时补充空白缓冲溶液;释放介质经 0.22 μ m 滤膜过滤,按拟定的色谱条件进样测定药物含量。

1.4.7 皮肤刺激性实验

小鼠适应性喂养 1 周后,实验开始前 24 h 将小鼠背部 2 cm $\times$ 2 cm 的毛剔除,随机分为 2 组,实验组涂抹 RES-NE,对照组涂抹生理盐水,每间隔 24 h 给药 1 次,每次 2 mL,持续 15 d,以生理盐水为对照,在每次用药后通过目视观察用药部位是否出现水肿及红斑情况,根据表 3 的标准评分对小鼠皮肤的状态进行评价;通过每天观察小鼠的瞳孔、行动、精神状况、饮食情况、排便情况、体重变化等来确定 RES-NE 是否对小鼠存在不良影响。第 14 天实验结束后,处死小鼠;将小鼠背部皮肤分离,使用多聚甲醛固定,制备 HE 染色切片,用于组织病理学研究。

表3 皮肤刺激性试验评分标准
Table 3. Scoring criteria of skin irritation test

出现现象类型	刺激反应程度	分值 (分)
水肿	无水肿	0
	勉强可见	1
	皮肤隆起,轮廓清晰	2
	水肿隆起约 1 mm	3
	水肿隆起超 1 mm	4
红斑	无现象	0
	勉强可见	1
	明显	2
	严重	3
	紫红色红斑、并焦痂	4

1.4.8 UV照射实验

UVB 照射装置波长范围为 280~320 nm,峰值 311 nm,UV 强度为 320 μ w/cm²,紫外灯距小鼠 30 cm。按照 UV 辐射剂量 115.2 mJ/cm² 进行照射。照射剂量以最小红斑量 (minimal erythematel dose, MED) 为单位,MED 指以出现最弱红斑反应所需的时间为标准,即某一部位距光源一定距离时,于 UV 照射后局部出现的肉眼能见的最弱红斑的时间,其剂量单位为 s。

取 SD 大鼠,剃去大鼠背部 3 cm $\times$ 5 cm 的鼠毛,将大鼠随机为 3 组:实验组、阳性对照组、阴性对照组。实验组涂抹 RES-NE、阳性对照组涂抹生理盐水,阴性对照组不做处理,在每次照射前

拍照记录背部皮肤状态并涂抹 RES-NE，每天按时照射 UV 并给药，每次给药 2 mL（对照组涂抹等量生理盐水），观察大鼠背部皮肤的变化。

2 结果

2.1 处方组成的初步筛选

2.1.1 油相、乳化剂和助乳化剂的筛选

由于油相、乳化剂、助乳化剂中其余种类对 RES 完全不溶或溶解度较低（表 4~表 6），故仅选择溶解度较大的种类作进一步筛选，如：油相中的茶油、WL 1349 和三乙酸甘油酯；乳化剂中的聚氧乙烯蓖麻油 EL-60、聚氧乙烯蓖麻油 EL-80 和聚氧乙烯氢化蓖麻油 CO-40；助乳化剂中的 1,2 丙二醇、DGMEA、PEG400。

表4 RES在不同油相中的溶解度（n=3）

辅料种类	溶解度（mg/mL）
WL1349	19.69
蓖麻油	1.10
油酸乙酯	2.78
肉豆蔻酸	3.79
茶油	46.66
1944CS	2.79
三乙酸甘油酯	12.98

表5 RES在不同乳化剂中的溶解度（n=3）

辅料种类	溶解度（mg/mL）
EL-60	95.51
EL-80	90.49
氢化EL-40	53.29
CO-40	72.72
kolliphor ELP	0.71
kolliphor HS15	2.05
kolliphor RH40	13.76
Labrafil M1944CS	4.63
吐温80	21.70
EL-10	30.23
EL-20	31.54
EL-35	25.51
EL-40	33.76
RH60	17.93

表6 RES在不同助乳化剂中的溶解度（n=3）

辅料种类	溶解度（mg/mL）
PEG400	229.59
1,2-丙二醇	86.92
DGMEA	88.86
无水乙醇	6.41
甘油	16.63
Lauroglycol 90	3.57
1,3-丁二醇	54.82

2.1.2 绘制空白辅料三元相图

分别以茶油、WL 1349、三乙酸甘油酯为油相，聚氧乙烯蓖麻油 EL-60、聚氧乙烯蓖麻油 EL-80、聚氧乙烯氢化蓖麻油 CO-40 为乳化剂，PEG400 对 RES 的溶解度明显高于其他助乳化剂，故以 PEG400 为助乳化剂，绘制伪三元相图（图 2）。图中闭合实线内均可形成均一、透明的溶液。当油相为三乙酸甘油酯时，绘制的伪三元相图乳化区域最大，故选择三乙酸甘油酯为油相。因 3 种乳化剂与三乙酸甘油酯成乳的区域一致，故选择对 RES 溶解度最高的聚氧乙烯蓖麻油 EL-60 作为乳化剂。为保证 RES-NE 的稳定性，选择成乳区域的中心位置所对应比例作为处方，即聚氧乙烯蓖麻油 EL-60：PEG400：三乙酸甘油酯=10：3：7。

2.1.3 RES-NE 的制备

确定的处方如下：将 1.4 g 油相（三乙酸甘油酯）、2.0 g 乳化剂（聚氧乙烯蓖麻油 EL-60）和 0.6 g 助乳化剂（PEG400）完全混合后，加入 0.175 g RES，磁力搅拌至完全溶解，用蒸馏水定容至 25 mL，继续磁力搅拌 10 min；20.5 kPa 微射流高压均质 4 次，得到澄明、均一的 RES-NE，1 000×g 离心 5 min 不分层，且未出现原料药物的析出。

2.2 含量测定

2.2.1 标准曲线的绘制

得到的线性回归方程为 $Y=1.398X-0.248$ （ $r=0.9990$ ），结果表明 RES 在 2.00~50.00 μg/mL 的浓度范围内与峰面积线性关系良好。测定出 RES-NE 中 RES 的含量为 6.761、6.776、6.753 mg/mL（n=3）。

2.2.2 稳定性试验

RES-NE 在 4℃ 中放置 45 d，通过 HPLC 法测得 RES-NE 中 RES 的含量在 99%~103% 之间（表 7），且未出现明显的分层现象以及药物的析出现象，表明 RES-NE 的稳定性较强。

2.3 RES-NE 粒径分布及 Zeta 电位测定

RES-NE 呈现白色透亮、形状均一、呈类球形乳滴，粒径为 (21.68 ± 3.89) nm，分散系数为 0.110 ± 0.010 ，表明 RES-NE 粒径较小且分布均匀；Zeta 电位为 (0.509 ± 0.145) mV，表明 RES-NE 表面荷正电，微粒间相互静电排斥，提高了 RES-NE 的分散性，有助于 RES-NE 的稳定性。RES-NE 的透射电镜图和粒径分布图见图 3。

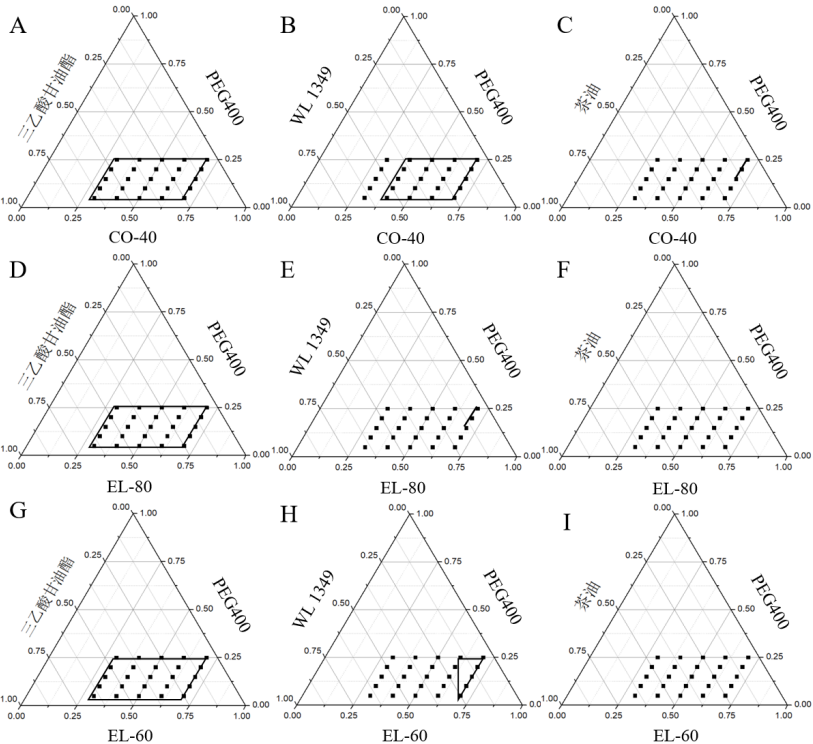


图2 RES-NE三元相图

Figure 2. Ternary phase diagram of RES-NE

注：A~C分别以CO-40、PEG400为乳化剂和助乳化剂，三乙酸甘油酯、WL 1349、茶油为油相；D~F分别以EL-80、PEG400为乳化剂和助乳化剂，三乙酸甘油酯、WL 1349、茶油为油相；G~I分别以EL-60、PEG400为乳化剂和助乳化剂，三乙酸甘油酯、WL 1349、茶油为油相。

表7 RES-NE的稳定性实验结果 (n=3)

Table 7. Experimental results of the stability of RES-NE (n=3)

放置时间 (d)	RES的含量 (%)
1	100.00 ± 0.21
3	99.45 ± 2.24
5	102.57 ± 0.85
7	102.05 ± 2.25
10	102.47 ± 1.36
20	100.66 ± 0.85
30	99.28 ± 2.98
45	101.85 ± 2.78

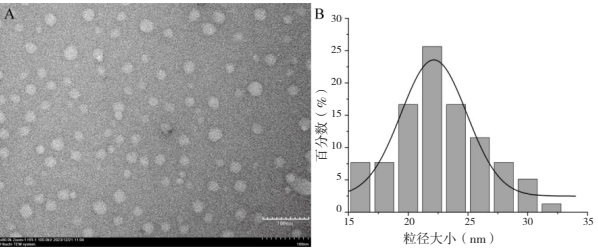


图3 RES-NE的透射电镜图 (A) 和粒径分布图 (B)

Figure 3. The transmission electron microscopy (A) and particle size distribution (B) of RES-NE

2.4 抗氧化实验

抗氧化实验结果见表8。结果表明，RES-NE对3种自由基均有很强的清除能力，RES-NE的体外抗氧化能力良好。

2.5 酪氨酸酶抑制实验

通过酪氨酸酶抑制实验结果见表9。结果表明，RES-NE能有效抑制酪氨酸酶的活性，具有一定的美白作用。

表8 RES-NE的抗氧化实验结果 (% , n=3)

Table 8. The antioxidant experiment results of RES-NE (% , n=3)

组别	DPPH自由基清除率	ABTS自由基清除率	羟自由基清除率
参比组	68.25 ± 2.28	82.91 ± 3.35	63.18 ± 0.30
RES-NE组	70.91 ± 2.68	69.68 ± 3.91	63.71 ± 0.41

表9 酪氨酸酶抑制实验结果 (% , n=3)

Table 9. The tyrosinase inhibition experiment results of RES-NE (% , n=3)

组别	酪氨酸酶抑制率
参比组	80.21 ± 0.37
RES-NE组	80.88 ± 0.23

2.6 体外释放实验

药物的体外释放度是考察药物质量评价的重要指标，在24 h内，RES-NE的体外释放率与时间的关系曲线见图4。药物从透析袋中缓释释放最终RES-NE释放率80%以上，该实验说明了RES-NE的体外释放率良好，具有一定的缓释作用。

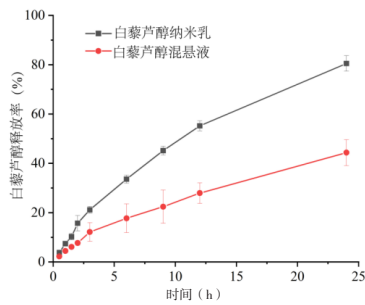


图4 RES-NE体外释放 (n=3)

Figure 4. *In vitro* release of RES-NE (n=3)

2.7 皮肤刺激性实验

两组小鼠在连续给药 14 d 后, 皮肤状态见图5A, 连续涂抹 RES-NE 或生理盐水后, 小鼠皮肤在第 1、7、14 天可以观察到其状态良好均未出现红斑及水肿且对小鼠的瞳孔、行动、精神状况、饮食及排便等均无副作用。根据皮肤刺激性试验评分标准, 确定 RES-NE 的刺激性指数 PII=0。HE 染色结果见图 5B, 与对照组相比, 涂抹 RES-NE 的小鼠背部切片未观察到组织病理学改变, 结果表明 RES-NE 对小鼠皮肤无刺激性, 药物性质安全可接触皮肤。

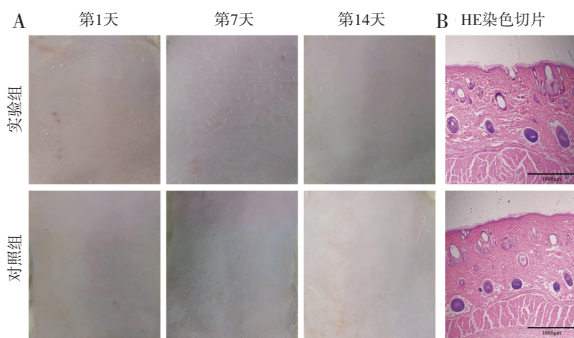


图5 RES-NE皮肤刺激性实验 (A) 和HE染色 (B, 4x) 结果

Figure 5. The skin irritation experiment (A) and HE staining (B, 4x) results of RES-NE

2.8 UV照射实验

在经 UV 照射 5 d 后, 大鼠的皮肤出现明显的大面积红斑, 未出现脱屑及结痂; 大鼠分别涂抹生理盐水、RES-NE 经 UV 照射处理后, 与阴性对照组相比, 皮肤在第 1、3、5 天的状态, 可以观察到大鼠皮肤接受以 MED 为单位的 UV 剂量照射数日后, 阳性对照组大鼠的皮肤变化显著, 出现了大面积的红斑, 表明其受到了 UV 照射的损伤; 而用药组照射前后无明显变化或出现极小面积的红斑, 说明皮肤没有受到较大程度的伤害。结果表明, RES-NE 具有一定的预防 UV 致皮肤损伤的作用, 具体见图 6。

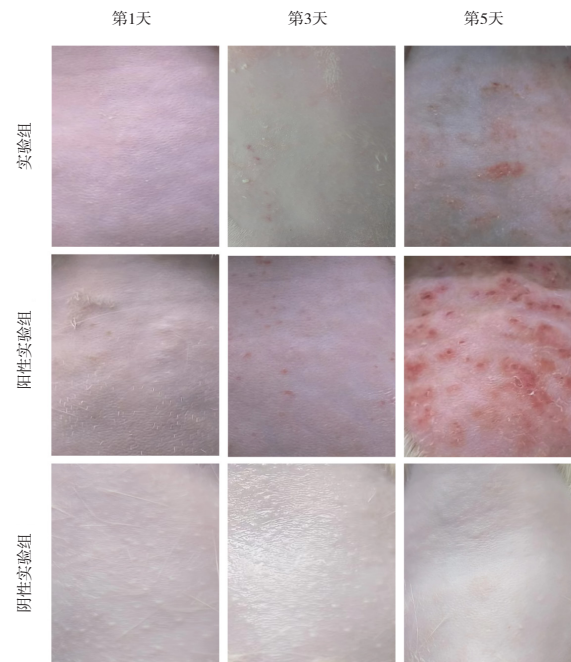


图6 抗UV照射实验结果图

Figure 6. Results of anti-UV irradiation experiment

3 讨论

RES 具有多重的药理活性, 如抗炎、抗氧化、抗衰老、抗癌、抗肿瘤、调控血糖、保护心脑血管、调节胆固醇、解热止痛等。但 RES 在体内生物利用度低, 在水中的溶解度仅 0.3 mg/L, 其结构上还有多个酚羟基, 见光易分解。本研究制备的 RES-NE 有效提高了 RES 的生物利用度及水溶性。在辅料筛选中, 首先通过确定 RES 在油相、乳化剂、助乳化剂中的溶解度, 以筛选出适宜的辅料, 再通过三元相图确定各辅料的投料比, 最后通过自乳化法制备出 RES-NE。

UV 辐射会对皮肤造成许多急性和慢性损伤^[18]。UV 包括 UVA、UVB、短波 UV (UVC), 其中 UVC 可被臭氧层吸收, 只有 UVA 及 UVB 会对人体造成影响^[19]。过量的 UV 剂量照射会对人体造成严重的伤害。在抗 UV 实验中, 涂抹了 RES-NE 的实验组大鼠, 在经过 UV 照射后, 皮肤表面未出现大面积红斑、水肿。结果发现, RES-NE 在一定程度上预防了 UV 对大鼠皮肤的损伤。

酪氨酸酶是一种含铜的氧化酶, 普遍存在于细菌、真菌、植物和哺乳动物中。其主要通过将 L-酪氨酸和 L-多巴氧化为多巴喹酮来催化黑色素的合成^[20]。黑色素是在黑色素细胞内生成的一种生物色素^[19], 在黑色素产生的过程中, 酪氨酸酶起

主要作用^[21]，黑色素过多会导致人体皮肤黑斑的形成。在酪氨酸酶抑制实验中，RES-NE能有效抑制酪氨酸酶的活性，结果表明，RES-NE在一定程度上具有美白祛斑的作用。通过该实验，可以进一步对RES-NE抑制L-酪氨酸转变为L-多巴进行深入研究，有望在抑制黑色素形成、抗衰老方面得到应用。

综上所述，本研究通过自乳化法成功制备出了RES-NE。通过对RES-NE的质量评价及预防UV所致皮肤损伤的作用等，研究发现RES-NE的性质稳定、载药量大、生物相容性高、制备工艺简单，且具有一定的抗氧化、抗UV能力。同时改善了RES在日常应用中的限制。

所有作者声明不存在利益冲突。

参考文献

- Salminen A, Kaarniranta K, Kauppinen A. Photoaging: UV radiation-induced inflammation and immunosuppression accelerate the aging process in the skin[J]. *Inflamm Res*, 2022, 71(7–8): 817–831. DOI: [10.1007/s00011-022-01598-8](https://doi.org/10.1007/s00011-022-01598-8).
- Abualakan K, Tajulurusn Q, Makpol S, et al. A scoping review on the effects of carotenoids and flavonoids on skin damage due to ultraviolet radiation[J]. *Nutrients*, 2022, 15(1): 92–109. DOI: [10.3390/nu15010092](https://doi.org/10.3390/nu15010092).
- Meng T, Xiao D, Muhammed A, et al. Anti-inflammatory action and mechanisms of resveratrol[J]. *Molecules*, 2021, 26(1): 229–244. DOI: [10.3390/molecules26010229](https://doi.org/10.3390/molecules26010229).
- Vervandier D, Latruffe N. The potential use of resveratrol for cancer prevention[J]. *Molecules*, 2019, 24(24): 4506–4518. DOI: [10.3390/molecules24244506](https://doi.org/10.3390/molecules24244506).
- Pinget L, Schellnegger M, Hecker A, et al. Resveratrol-induced signal transduction in wound healing[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(23): 12614–12632. DOI: [10.3390/ijms222312614](https://doi.org/10.3390/ijms222312614).
- Zhou DD, Luo M, Huang Y, et al. Effects and mechanisms of resveratrol on aging and age-related diseases[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 9932218. DOI: [10.1155/2021/9932218](https://doi.org/10.1155/2021/9932218).
- Pasquariello R, Verdile N, Brevini TAL, et al. The role of resveratrol in mammalian reproduction[J]. *Molecules*, 2020, 25(19): 4554–4570. DOI: [10.3390/molecules25194554](https://doi.org/10.3390/molecules25194554).
- Pallàs M, Porquet D, Vicente A, et al. Resveratrol: new avenues for a natural compound in neuroprotection[J]. *Curr Pharm Des*, 2013, 19(38): 6726–6731. DOI: [10.2174/1381612811319380005](https://doi.org/10.2174/1381612811319380005).
- Garcia CR, Malik MH, Biswas S, et al. Nanoemulsion delivery systems for enhanced efficacy of antimicrobials and essential oils[J]. *Biomater Sci*, 2022, 10(3): 633–653. DOI: [10.1039/d1bm01537k](https://doi.org/10.1039/d1bm01537k).
- Nasiri MI, Vora LK, Ershaid JA, et al. Nanoemulsion-based dissolving microneedle arrays for enhanced intradermal and transdermal delivery[J]. *Drug Deliv Transl Res*, 2022, 12(4): 881–896. DOI: [10.1007/s13346-021-01107-0](https://doi.org/10.1007/s13346-021-01107-0).
- Pandey P, Gulati N, Makhija M, et al. Nanoemulsion: a novel drug delivery approach for enhancement of bioavailability[J]. *Recent Pat Nanotechnol*, 2020, 14(4): 276–293. DOI: [10.2174/1872210514666200604145755](https://doi.org/10.2174/1872210514666200604145755).
- Pacheco MT, Silva ACG, Nascimento TL, et al. Protective effect of sucupira oil nanoemulsion against oxidative stress in UVA-irradiated HaCaT cells[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2019, 71(10): 1532–1543. DOI: [10.1111/jphp.13148](https://doi.org/10.1111/jphp.13148).
- Yousry C, Saber MM, Abd-Elsalam WH. A cosmeceutical topical water-in-oil nanoemulsion of natural bioactives: design of experiment, in vitro characterization, and in vivo skin performance against UVB irradiation-induced skin damages[J]. *Int J Nanomedicine*, 2022, 17: 2995–3012. DOI: [10.2147/ijn.s363779](https://doi.org/10.2147/ijn.s363779).
- Arianto A, Cella G, Bangun H. Preparation and evaluation of sunscreen nanoemulsions with synergistic efficacy on SPF by combination of soybean oil, avobenzone, and octyl methoxycinnamate[J]. *Open Access Maced J Med Sci*, 2019, 7(17): 2751–2756. DOI: [10.3889/oamjms.2019.745](https://doi.org/10.3889/oamjms.2019.745).
- Sato K, Takahashi M, Takada Y. Construction of Ti–Nb–Ti(2)Cu pseudo-ternary phase diagram[J]. *Dent Mater J*, 2020, 39(3): 422–428. DOI: [10.4012/dmj.2018-394](https://doi.org/10.4012/dmj.2018-394).
- Kassae SN, Mahboobian MM. Besifloxacin-loaded ocular nanoemulsions: design, formulation and efficacy evaluation[J]. *Drug Deliv Transl Res*, 2022, 12(1): 229–239. DOI: [10.4012/dmj.2018-394](https://doi.org/10.4012/dmj.2018-394).
- Dong B, Chen J, Cai Y, et al. In vitro and in vivo evaluation of cinnamaldehyde microemulsion-mucus interaction[J]. *J Food Biochem*, 2022, 46(10): e14307–e14321. DOI: [10.1111/jfbc.14307](https://doi.org/10.1111/jfbc.14307).
- Lai X, Wichers HJ, Soler-Lopez M, et al. Structure and function of human tyrosinase and tyrosinase-related proteins[J]. *Chemistry*, 2018, 24(1): 47–55. DOI: [10.1002/chem.201704410](https://doi.org/10.1002/chem.201704410).
- Inbaraj BS, Hua LH, Chen BH. Comparative study on inhibition of pancreatic cancer cells by resveratrol gold nanoparticles and a resveratrol nanoemulsion prepared from grape skin[J]. *Pharmaceutics*, 2021, 13(11): 1871–1890. DOI: [10.3390/pharmaceutics13111871](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13111871).
- Panoutsopoulou E, Zbytovská J, Vávrová K, et al. Phospholipid-based microemulsions for cutaneous imiquimod delivery[J]. *Pharmaceutics* (Basel), 2022, 15(5): 515–528. DOI: [10.3390/ph15050515](https://doi.org/10.3390/ph15050515).
- Cordero RJB, Casadevall A. Melanin[J]. *Curr Biol*, 2020, 30(4): R142–R143. DOI: [10.1016/j.cub.2019.12.042](https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.12.042).

收稿日期: 2024 年 04 月 16 日 修回日期: 2024 年 07 月 25 日
 本文编辑: 钟巧妮 李 阳