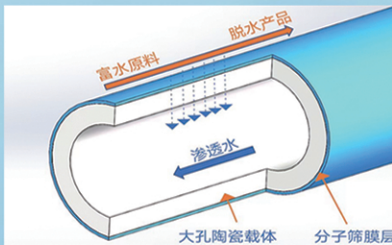
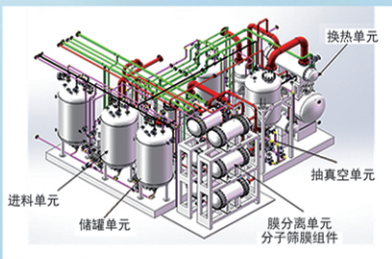




浙江汇甬新材料有限公司

# 微波合成第二代脱水膜



收率高、能耗低、连续脱水、无需再生

在如下领域的有机物脱水精制已有工业化应用

锂电池电解液溶剂及NMP生产、回收  
BDO产业链、煤化工、石油化工精细化学品  
制药行业、溶媒回收、燃料乙醇、超纯溶剂

广泛适用于醇类、醚类、酯类、酮类、苯系物、卤代烃的脱水精制



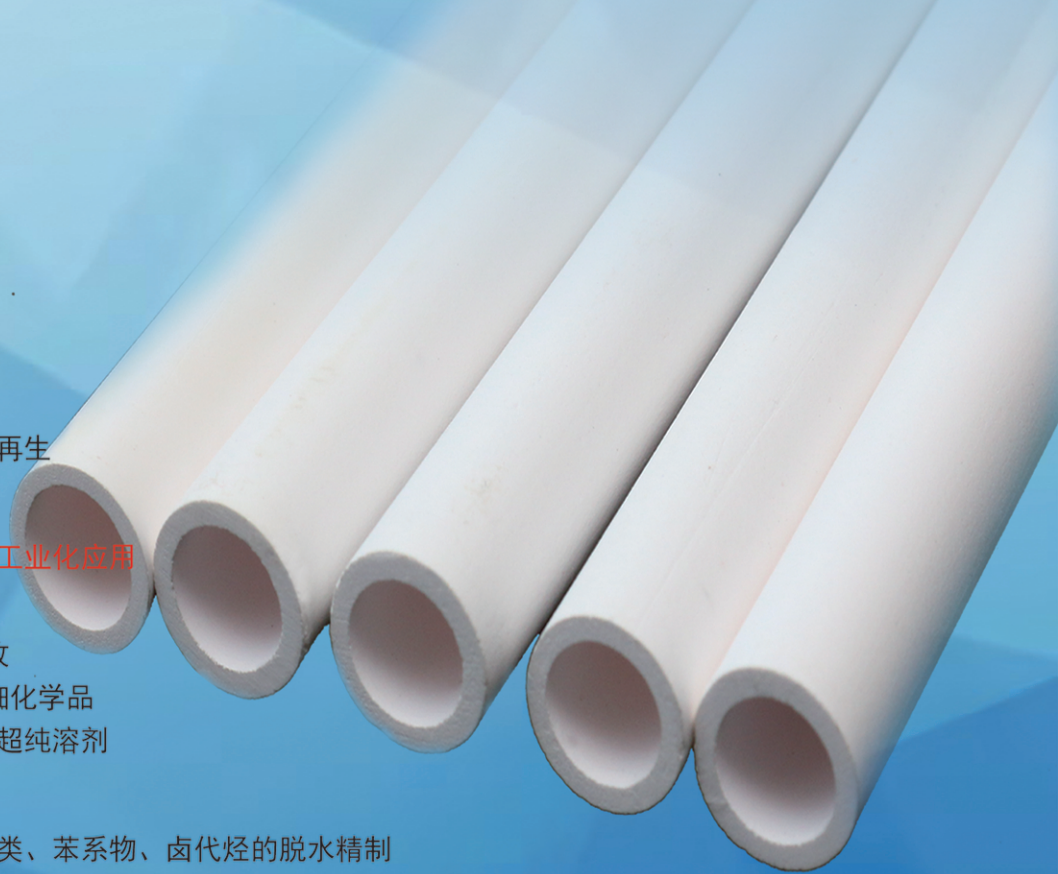
网址: [www.hymater.com](http://www.hymater.com)

固定电话: 0574-87648996

电话: 13396592011

地址: 浙江省宁波市江北高新园区庆丰路联东U谷国际港56号楼

国家自然科学基金二等奖 成果转化  
IChemE全球 创新产品冠军  
微波分子筛膜 脱水性能遥遥领先  
共沸体系、热敏体系、含水有机物脱水精制换代技术



医药与日化原料

# 包封视黄醇棕榈酸酯和肌肽的二元神经酰胺醇质体的制备和性能

梁 蓉<sup>1,2</sup>, 贾利萍<sup>1,2</sup>, 杨 成<sup>1,2</sup>

(1. 江南大学 化学与材料工程学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 合成与生物胶体教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

**摘要:** 为了提高醇质体的稳定性和经皮输送效果, 采用无水乙醇/丙二醇 (PG) 混合物对视黄醇棕榈酸酯 (RP) 和肌肽 (Car) 进行包封, 构建了 RP-Car 二元神经酰胺醇质体 (RC 醇质体)。结合粒径测定、TEM 和激光共聚焦显微镜 (CLSM) 表征, 考察了 RC 醇质体储藏稳定性和透皮性能。结果表明, 当  $V(\text{无水乙醇}):V(\text{PG})=6:4$  时, 制备的 RC 醇质体为较规则的球状囊泡, 平均粒径为 70 nm 左右; RC 醇质体中 RP 的包封率为  $80.28\% \pm 0.10\%$ , Car 的包封率为  $47.20\% \pm 0.71\%$ ; RC 醇质体在 4、25 和 45 °C 下储藏 120 d 时, 粒径无明显变化, 且在 25 °C 下储藏 120 d 时 RP 和 Car 的保留率也无明显变化; RP 和 Car 经醇质体包封后, 在透皮实验中 12 h 皮肤的累积量为  $(0.273 \pm 0.002)$  和  $(22.521 \pm 0.280) \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , Car 在皮肤的渗透量为  $(20.559 \pm 0.120) \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。

**关键词:** 神经酰胺; 二元醇质体; 视黄醇棕榈酸酯; 肌肽; 乙醇注入法; 医药原料

**中图分类号:** TQ658 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5214 (2025) 01-0159-07

## Preparation and properties of binary ceramide modified ethosomes for encapsulation of retinol palmitate and carnosine

LIANG Rong<sup>1,2</sup>, JIA Liping<sup>1,2</sup>, YANG Cheng<sup>1,2</sup>

(1. School of Chemical & Material Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China; 2. Key Laboratory of Synthetic and Biological Colloids, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China)

**Abstract:** In order to improve the stability and transdermal efficacy of ethosomes, RP-Car binary ceramide modified ethosomes (RC alcoholosome) was synthesized by encapsulation of retinol palmitate (RP) and carnosine (Car) with ethanol absolute/propylene glycol (PG) mixture. The storage stability and transdermal properties were evaluated through particle size, TEM and confocal laser scanning microscopy (CLSM). The results showed that when the volume ratio of ethanol absolute to PG was 6 : 4, the RC ethosomes presented as relatively regular spherical vesicles with a particle size of about 70 nm. And the encapsulation efficiency of RP and Car in the RC ethosomes was  $80.28\% \pm 0.10\%$  and  $47.20\% \pm 0.71\%$ , respectively. The particle size of RC ethosomes exhibited no significant changes after 120 d of storage at 4, 25 and 45 °C, while the retention rate of RP and Car in RC ethosomes also showed no significant changes after 120 d of storage at 25 °C. After encapsulation with ethosomes, the amount of RP and Car accumulated for 12 h in the skin were  $(0.273 \pm 0.002)$  and  $(22.521 \pm 0.280) \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , respectively, while the skin permeability of Car increased to  $(20.559 \pm 0.120) \mu\text{g}/\text{cm}^2$ .

**Key words:** ceramide; binary ethosomes; retinol palmitate; carnosine; ethanol injection; drug materials

醇质体是在传统脂质体基础上加入高质量分数 (20%~50%) 的醇后具有流动性高、包封率高和皮肤渗透性强等优点的新型脂质体。然而, 较高的流

动性会导致其稳定性变差、药物易泄漏, 因而在实际应用中受到限制。

神经酰胺 3 (Cer3) 作为化妆品常用的活性成

收稿日期: 2023-12-11; 定用日期: 2024-01-22; DOI: 10.13550/j.jxhg.20231065

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2016YFD0400801)

作者简介: 梁 蓉 (1983—), 女, 副教授, E-mail: rongliang@jiangnan.edu.cn.

分, 具有保湿、抗衰及修复皮肤屏障的作用<sup>[1]</sup>。HYEON 等<sup>[2]</sup>研究表明, Cer3 修饰可以提高醇质体的稳定性, 本课题组在前期研究中成功制备了神经酰胺修饰的醇质体, 其能够提高体系的稳定性<sup>[3]</sup>。但醇质体仍存在包封率低且具有一定刺激性的缺点。近年来, 一些研究者将乙醇替换为乙醇/丙二醇 (PG) 混合物来制备醇质体<sup>[4-5]</sup>。与乙醇相比, PG 具有更好的保湿能力和更低的刺激性<sup>[6]</sup>。且 PG 的加入可以提高囊泡稳定性和包封率<sup>[7-8]</sup>。此外, 乙醇/PG 的有效组合还能提高二元醇质体中药物在皮肤中的累积量<sup>[9]</sup>。为进一步考察神经酰胺修饰的二元醇质体的透皮性能, 需选取合适的活性物进行包封。目前, 醇质体用于单一活性物的包封研究很多<sup>[10-15]</sup>, 但醇质体用于双重活性物的包封鲜有报道<sup>[16-17]</sup>。视黄醇棕榈酸酯 (RP) 是一种脂溶性活性物, 在皮肤上的主要功效为抗衰老、抗光老化、修复皮肤及祛痘等<sup>[18]</sup>。然而, 其对紫外线辐射、氧、温度等因素敏感<sup>[19]</sup>。肌肽 (Car) 是由 L-组氨酸和  $\beta$ -丙氨酸组成的水溶性小分子二肽, 具有抗氧化、抗糖基化、抗炎等多种生物学作用, 但其极易被肌肽酶识别降解<sup>[20]</sup>。醇质体既有亲水核心, 又有疏水双分子层脂质膜, 能够提供同时包封 RP 和 Car 并保持其生物活性的可能性。

本文拟采用具有不同体积比的无水乙醇 (简称乙醇)/PG 混合物对 RP 和 Car 进行包封来构建 RP-Car 二元神经酰胺醇质体 (记为 RC 醇质体), 考察 RC 醇质体储藏稳定性和透皮性能, 旨在为不同功效的活性物的共输送及皮肤促渗方案提供一定的参考。技术路线图如图 1 所示。

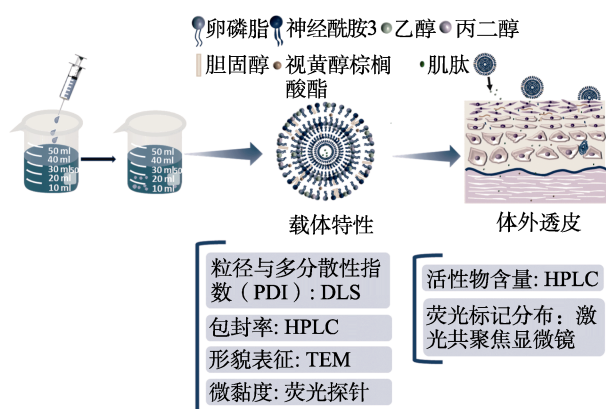


图 1 技术路线图

Fig.1 Tchnology road map

## 1 实验部分

### 1.1 材料、试剂与仪器

猪皮, 购自无锡雪浪菜市场; Cer3 (质量分数

99%), 韩国 DOOSAN 公司; 卵磷脂 (PC60, 质量分数 60%), 河北美亚斯生物技术有限公司; 胆固醇 (Chol, 质量分数 99%), 北京伊诺凯科技有限公司; RP (质量分数 99%), 荷兰帝斯曼 (中国) 有限公司; Car (质量分数 99%), 德之馨香精香料 (南通) 有限公司; 甲醇, 色谱纯, 上海泰坦科技有限公司; 无水乙醇, 色谱纯, 阿拉丁试剂 (上海) 有限公司; 磷钨酸 (质量分数 99%), 北京沃凯生物科技有限公司; 1,8-苯丙氨基萘磺酸 (ANS, 质量分数 98%)、1,6-二苯基-1,3,5-己三烯 (DPH, 质量分数 98%)、1,6-二苯基-1,3,5-己三烯-4'-甲苯磺酸三甲基铵 (TMA-DPH, 质量分数 98%), 美国 Sigma 公司; 尼罗红, AR, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 异硫氰酸荧光素 (FITC), AR, 上海麦克林生化科技股份有限公司; OCT 冰冻切片包埋剂, BR, 美国 Sakura 公司; 无水乙醇、PG、磷酸氢二钾、磷酸盐缓冲液速溶颗粒 (PBS, pH=7.4)、二甲基亚砜 (DMSO), AR, 国药集团化学试剂有限公司。

Zeta PALS 型 Zeta 电位及纳米粒度分析仪, 美国 Brookhaven 仪器公司; Ultimate 3000 型超高效液相色谱仪 (HPLC), 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; JEM-2100 Plus 型透射电子显微镜 (TEM), 日本电子株式会社; TK-12D 型透皮扩散试验仪, 上海镭凯科技贸易有限公司; TCS SP8 型激光共聚焦显微镜 (CLSM), 德国 Leica 公司; F-7000 型荧光光谱仪, 日本日立公司。

### 1.2 制备方法

采用乙醇注入法制备 RC 醇质体。精确称取 375 mg PC60、15 mg 胆固醇、15 mg Cer3、30 mg RP 于 50 mL 烧杯中, 共准备 5 份; 接着, 量取总体积为 5 mL  $V(\text{无水乙醇}): V(\text{PG})$  为 9:1、8:2、7:3、6:4、5:5 的混合醇分别置于上述烧杯中, 将混合物置于 60 °C 水浴锅中加热至澄清透明, 得有机相 A; 量取 750 mg Car、10 mL 去离子水于另一个 50 mL 烧杯中, 在 45 °C 下水浴加热, 即为水相 B; 用 1 mL 注射器吸取有机相 A 缓慢匀速地注入到水相 B 中, 继续水合 20 min, 即得不同 RC 醇质体。

### 1.3 性能测试与表征方法

#### 1.3.1 粒径与 PDI 的测定

吸取 RC 醇质体样品并用去离子水稀释, 使用 Zeta 电位及纳米粒度分析仪在散射角为 90°、温度为 25 °C 条件下对 RC 醇质体的粒径及 PDI 进行测定, 每个样品平行测定 3 次。

#### 1.3.2 RC 醇质体双分子层膜微黏度的测定

参照张雅琪<sup>[21]</sup>的方法, 精确称取适量 TMA-DPH 溶解于体积分数为 50% 的四氢呋喃水溶液中, 得到  $1 \times 10^{-2}$  mol/L 的 TMA-DPH 储备液<sup>[22]</sup>; 然后,

精准吸取 100  $\mu\text{L}$  TMA-DPH 储备液于 10 mL 容量瓶中, 用 0.01 mol/L 的 PBS (pH=7.4, 0.15 mol/L 的 NaCl) 定容, 即得  $1 \times 10^{-4}$  mol/L 的 TMA-DPH 工作液。将 DPH 溶于四氢呋喃中, 配制得到  $2 \times 10^{-3}$  mol/L 的 DPH 储备液, 精确吸取 DPH 储备液 100  $\mu\text{L}$  于 10 mL 容量瓶中, 用 0.01 mol/L 的 PBS (pH=7.4, 0.15 mol/L 的 NaCl) 定容, 即得  $2 \times 10^{-5}$  mol/L 的 DPH 工作液。TMA-DPH 和 DPH 工作液均需要现配现用。精确称取 ANS, 将其溶于无水乙醇中, 配制  $6 \times 10^{-3}$  mol/L 的 ANS 储备液。

在进行膜微黏度测定前, 将提前配制好的荧光探针工作液与不同 RC 醇质体混合均匀。其中, TMA-DPH、DPH 和 ANS 探针浓度分别为  $1 \times 10^{-5}$ 、 $1 \times 10^{-5}$  和  $3 \times 10^{-4}$  mol/L; 然后, 将混合均匀的样品置于 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴锅中保温, 保温时间分别为 30 min (TMA-DPH)、60 min (DPH) 和 30 min (ANS), 保温后于室温下使用荧光光谱仪进行测定。参数设置为: TMA-DPH [激发波长 ( $E_x$ )=365 nm、发射波长 ( $E_m$ )=430 nm]; DPH ( $E_x$ =358 nm、 $E_m$ =425 nm); ANS ( $E_x$ =337 nm、 $E_m$ =425 nm); 狭缝宽度为 5 nm。在测定过程中, 先将样品置于垂直偏振光下, 得到该荧光的垂直偏振分量  $I_{0,0}$  和水平偏振分量  $I_{90,90}$ ; 然后, 将样品置于水平偏振光下, 得到该荧光垂直偏振分量  $I_{90,0}$  和水平偏振分量  $I_{0,90}$ , 最后, 按式 (1) ~ (3) 计算微黏度:

$$G = \frac{I_{90,90}}{I_{90,0}} \quad (1)$$

$$P = \frac{I_{0,0} - GI_{0,90}}{I_{0,0} + GI_{0,90}} \quad (2)$$

$$\eta = \frac{2P}{0.46 - P} \quad (3)$$

式中:  $G$  为仪器光栅校正系数;  $P$  为荧光偏振度;  $\eta$  为微黏度。

### 1.3.3 RP 包封率的测定

RP 的质量浓度采用 HPLC 测定: 色谱柱为 Diamonsil  $\times$  C18 色谱柱 (4.6 mm $\times$ 150 mm $\times$ 5  $\mu\text{m}$ ); 流动相为  $V(\text{乙醇}):V(\text{甲醇})=9:1$ ; 流速 1.0 mL/min; 检测波长 329 nm; 进样量 2  $\mu\text{L}$ 。

醇质体中 RP 包封率的测定参照韩晓乐<sup>[23]</sup>和 CHEN 等<sup>[24]</sup>的方法, 并稍作改动。首先, 采用截留相对分子质量为 3.5 kDa 的透析袋分离游离的 RP, 将 2 mL RC 醇质体置于透析袋中; 然后, 将透析袋放入 200 mL 体积分数 33.3% 的乙醇水溶液中, 待游离的 RP 完全透析出后, 取出透析袋内的 RC 醇质体加入无水乙醇超声破乳后定容, 经 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤后, 测定 RP 包封质量浓度 ( $\rho_{\text{en}}$ , g/L); 取

等量未透析的 RC 醇质体加入无水乙醇超声破乳并定容, 经 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤后测定 RP 总质量浓度 ( $\rho_{\text{total}}$ , g/L), 根据式 (4) 计算醇质体中 RP 的包封率:

$$\text{包封率} / \% = \left( \frac{\rho_{\text{en}}}{\rho_{\text{total}}} \right) \times 100 \quad (4)$$

### 1.3.4 Car 包封率的测定

Car 的质量浓度采用 HPLC 测定: 色谱柱为 Xbridge<sup>®</sup> BEH 色谱柱 (4.6 mm $\times$ 250 mm $\times$ 5  $\mu\text{m}$ ); 流动相 (pH=6.30) 为  $V(\text{甲醇}):V(40 \text{ mmol/L 的磷酸氢二钾水溶液})=3:7$ ; 流速 1.0 mL/min; 检测波长 210 nm; 进样量 1  $\mu\text{L}$ 。

醇质体中 Car 包封率的测定参照 HU 等<sup>[25]</sup>的方法。使用超滤离心法分离 RC 醇质体和游离 Car, 并稍作改动。取新制备的 RC 醇质体 0.5 mL, 置于 10 mL 容量瓶中, 加入 1 mL 无水乙醇, 超声破乳 20 min 后加超纯水定容, 经 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤后, 测得 Car 总质量浓度 ( $\rho_t$ , g/L); 然后, 精确移取等量制备好的 RC 醇质体, 置于截留相对分子质量为 3 kDa 的超滤离心管中, 并在 12000 r/min 下离心 15 min, 收集滤液用高效液相色谱仪测得游离 Car 质量浓度 ( $\rho_f$ , g/L), 按式 (5) 计算 Car 的包封率:

$$\text{包封率} / \% = \left( \frac{\rho_t - \rho_f}{\rho_t} \right) \times 100 \quad (5)$$

### 1.3.5 TEM 测试

用超纯水将 RC 醇质体稀释后分别滴加到铜网上, 室温下风干 15 min, 然后用质量分数为 2% 的磷钨酸溶液对醇质体染色 5 min, 用干净的滤纸吸去染色液, 再吸取少量超纯水, 滴在铜网上冲洗 2~3 次, 用滤纸吸去水。最后放入 50  $^{\circ}\text{C}$  烘箱中干燥 8 h 后, 使用 TEM 在 120 kV 下进行观察。

### 1.3.6 RC 醇质体的稳定性测试

将 RC 醇质体置于 4、25 和 45  $^{\circ}\text{C}$  下分别放置 120 d, 观察其粒径和 PDI 变化。同时, 采用 RP 和 Car 直接溶解于水醇溶液的样品为对照样品 (RP-Car 水醇溶液), 考察 RC 醇质体在室温储藏 120 d 过程中, RP 和 Car 的保留率变化。其中, RP-Car 水醇溶液是将 30 mg RP 溶于 5 mL  $V(\text{乙醇}):V(\text{PG})=6:4$  的混合醇中, 750 mg Car 溶于 10 mL 水中, 然后将以上醇、水溶液混合制得。

按 1.3.3 和 1.3.4 节中的方法, 采用 HPLC 测定新制备和在 25  $^{\circ}\text{C}$  下放置一段时间后样品中 RP 和 Car 的质量浓度, 并根据式 (6) 计算 RP 和 Car 的保留率:

$$\text{保留率} / \% = \frac{\rho_t}{\rho_0} \times 100 \quad (6)$$

式中： $\rho_t$  为储藏时间  $t$  后样品中 RP 或 Car 的质量浓度，g/L； $\rho_0$  为储藏开始前样品中 RP 或 Car 的质量浓度，g/L。

### 1.3.7 体外透皮性能测试

参照 PARK 等<sup>[26]</sup>的方法并稍作改动。首先，配制 PBS 溶液（pH=7.4）作为冲洗液；然后，按照  $V(\text{PBS 溶液}) : V(\text{无水乙醇}) = 1 : 2$ ，取适量 PBS 溶液加入无水乙醇，制成无水乙醇 PBS 溶液，作为接收液。取干净且无痕的猪背部皮肤，用 PBS 溶液进行冲洗。Franz 扩散池中放入小转子后，将剪成圆形的猪皮夹在供给池和接收池之间，并将角质层朝向供给池，用马蹄夹夹紧。向供给池中分别加入 2 mL RP-Car 水醇溶液和 RC 醇质体；然后，将 Franz 扩散池小心地放入透皮扩散试验仪中进行透皮，其参数设置如下：水浴温度 37 °C、透皮时间 12 h、转速 400 r/min。

#### 1.3.7.1 皮肤沉积累积量的测定

透皮结束后，先用 PBS 溶液冲洗猪皮 3 次；然后，采用胶带剥离法对皮肤进行处理，剥离角质层；接着，用剪刀将剩余的表皮和真皮一起剪碎。将带有药物的胶带和剪碎的猪皮放入 15 mL 离心管，加入 3 mL 无水乙醇（简称乙醇）用于萃取 RP 或水用于萃取 Car，超声 30 min 并以 5000 r/min 转速离心 15 min。采用 HPLC 分别测定皮肤中的 RP 和 Car 质量浓度，按式（7）计算 RP 和 Car 的皮肤累积量：

$$\text{皮肤累积量} = 1000\rho \times V/A \quad (7)$$

式中： $\rho$  为萃取液中 RP 或 Car 的质量浓度，g/L； $V$  为萃取溶剂体积，为 3 mL； $A$  为渗透面积，为 3.14 cm<sup>2</sup>。

#### 1.3.7.2 皮肤渗透累积量的测定

参照林碧雯<sup>[27]</sup>的方法对皮肤渗透累积量进行测定，并稍作改动。分别在 1、2、4、6、8、10 和 12 h 吸取接收液 0.5 mL，并补充等量接收液，分别用 HPLC 测定接收液中 RP 和 Car 的质量浓度，采用式（8）计算皮肤渗透累积量：

$$Q_n = \left( 1000\rho_n \times V + 1000V_1 \sum_{i=1}^{n-1} \rho_i \right) / A \quad (8)$$

式中： $Q_n$  为 RP 或 Car 皮肤渗透累积量， $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ； $\rho_n$ 、 $\rho_i$  为第  $n$ 、 $i$  个取样点测得的 RP 或 Car 质量浓度，g/L； $V_1$  和  $V$  分别为取样体积和接收池体积，mL； $A$  为渗透面积，为 3.14 cm<sup>2</sup>。

### 1.3.8 猪皮的 CLSM 测试

参照谢桂杰等<sup>[28]</sup>的方法，在有机相中加入 20  $\mu\text{L}$  质量浓度为 1 g/L 尼罗红乙醇溶液，在水相中加入 20  $\mu\text{L}$  质量浓度为 1 g/L FITC-DMSO 溶液，按 1.2 节和 1.3.6 节中的方法制备含有尼罗红和 FITC 的 RC 醇质体和 RP-Car 水醇溶液用于透皮实验。在

体外渗透实验结束后，用清水冲洗猪皮，然后用滤纸吸干。将猪皮剪成条状置于冰冻样品托中，并用包埋剂包裹后置于 -20 °C 冰箱冷冻。然后，使用冷冻切片机将其切成厚度为 20  $\mu\text{m}$  的薄片，并置于载玻片上避光放置。将不同样品用 CLSM 进行观察，分别以 488 和 552 nm 波长激发 FITC 和尼罗红，先在明场下找到样品并调整焦距，然后，采集图像并重叠通道获得叠加图。

### 1.4 数据处理

采用 Graphpad Prism 软件中的 ANOVA 等方法进行数据分析，数据以“平均值 $\pm$ 标准偏差”表示，所有实验至少重复 3 次（相关系数  $P < 0.05$ ）。

## 2 结果与讨论

### 2.1 乙醇与 PG 体积比对 RC 醇质体的影响

图 2 为  $V(\text{乙醇}) : V(\text{PG})$  对 RC 醇质体的粒径、PDI 和包封率的影响。

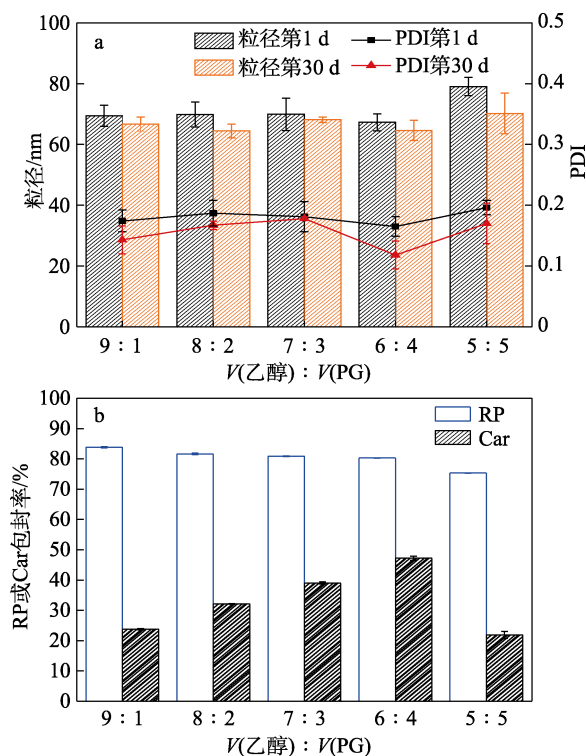


图 2  $V(\text{乙醇}) : V(\text{PG})$  对 RC 醇质体的粒径、PDI (a) 和包封率 (b) 的影响

Fig. 2 Effect of  $V(\text{ethanol}) : V(\text{PG})$  on particle size, PDI (a) and encapsulation rate (b) of RC ethosomes

从图 2a 可以看出，随着  $V(\text{乙醇}) : V(\text{PG})$  从 9 : 1 减小至 6 : 4，RC 醇质体的平均粒径约为 70 nm，PDI 约为 0.17，均无明显变化；当  $V(\text{乙醇}) : V(\text{PG}) = 5 : 5$  时，RC 醇质体的粒径出现了一定程度的增加，平均粒径达到 79 nm。从图 2b 可以看出，随着  $V(\text{乙醇}) : V(\text{PG})$  从 9 : 1 减至 6 : 4，水溶性活

性物 Car 的包封率显著从 23.78%±0.24%提高至 47.20%±0.71%, 但当  $V(\text{乙醇}) : V(\text{PG})=5 : 5$  时, 又显著降至 21.90%±1.19%; 而 RP 的包封率随着  $V(\text{乙醇}) : V(\text{PG})$  的减小呈下降趋势, 从 83.87%±0.23%降至 75.30%±0.08%。以上实验结果与前期相关研究结果一致<sup>[29-30]</sup>。这是因为, 一定量 PG 的加入能有效提高水溶性活性物 Car 的包封率, 但加入过量 PG 时, RC 醇质体粒径会增加, 从而降低体系的稳定性。

### 2.2 乙醇与 PG 体积比对 RC 醇质体双分子层膜微黏度的影响

图 3 为  $V(\text{乙醇}) : V(\text{PG})$  对 RC 醇质体双分子层膜微黏度的影响。

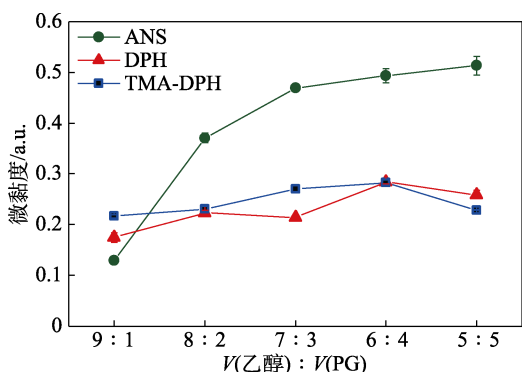


图 3  $V(\text{乙醇}) : V(\text{PG})$  对 RC 醇质体的双分子层微黏度的影响

Fig. 3 Effect of  $V(\text{ethanol}) : V(\text{PG})$  on microviscosity of RC ethosomes bilayer

ANS、TMA-DPH 和 DPH 3 种荧光探针可分别定位于卵磷脂头部亲水区域、双分子层的脂-水界面和疏水区域。因此, 可通过测定其各自的各向异性来反映所定位区域的膜微黏度<sup>[31]</sup>。从图 3 可以看出, 随着  $V(\text{无水乙醇}) : V(\text{PG})$  的减小, ANS 荧光探针显示, 卵磷脂头部亲水区域的微黏度逐渐增加, 这说明 PG 主要分布在双分子层卵磷脂头部亲水区域, 当  $V(\text{乙醇}) : V(\text{PG})=6 : 4$  时, 其亲水区微黏度基本达到平衡; 而 TMA-DPH 和 DPH 荧光探针显示, 双分子层的脂-水界面和疏水区域的微黏度在  $V(\text{乙醇}) : V(\text{PG})$  从 9:1 减小至 6:4 之前变化缓慢, 直至  $V(\text{乙醇}) : V(\text{PG})=5 : 5$  时, 才出现一定程度的下降。以上变化趋势与 2.1 节中粒径和包封率的变化结果一致, 说明 PG 可渗透到卵磷脂膜材中, 降低双分子层的流动性, 并增加其亲水性, 从而提高了水溶性活性物 Car 的包封率。但当  $V(\text{乙醇}) : V(\text{PG})=5 : 5$  时, 会扰乱双分子层的稳定性, 进而降低活性物的包封效果。因此, 可优选  $V(\text{乙醇}) : V(\text{PG})=6 : 4$  作为最佳体积比, 此时 Car 的包封率最大, 为 47.20%±0.71%, RP 的包封率为 80.28%±0.10%。

### 2.3 RC 醇质体的形貌

图 4 为  $V(\text{乙醇}) : V(\text{PG})=6 : 4$  作为最佳体积比时制备的 RC 醇质体的 TEM 图。

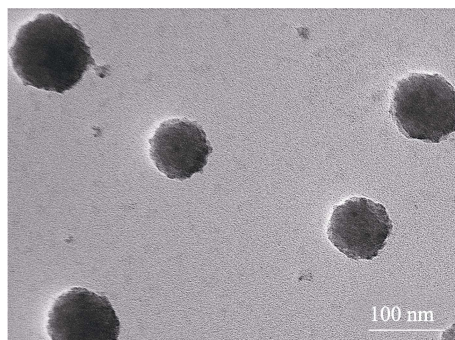


图 4 RC 醇质体的 TEM 图

Fig. 4 TEM image of RC ethosomes

从图 4 可以看出, RC 醇质体是较为规则且较为均一的球状囊泡, 粒径在 60~100 nm, 与图 2a 结果一致。

### 2.4 RC 醇质体的储藏稳定性

图 5 为  $V(\text{乙醇}) : V(\text{PG})=6 : 4$  作为最佳体积比时制备的 RC 醇质体在 4、25 和 45 °C 下的粒径稳定性。

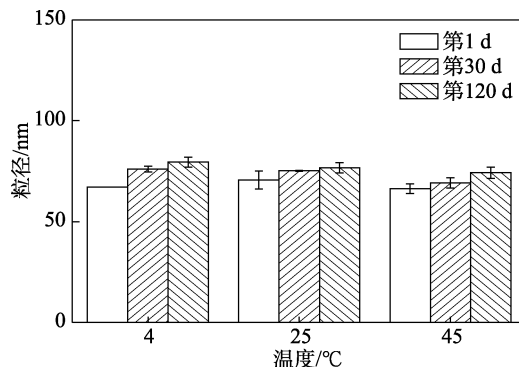
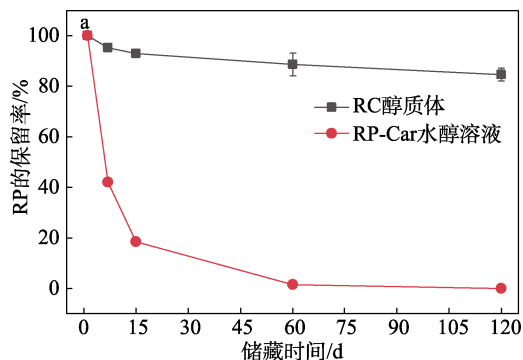


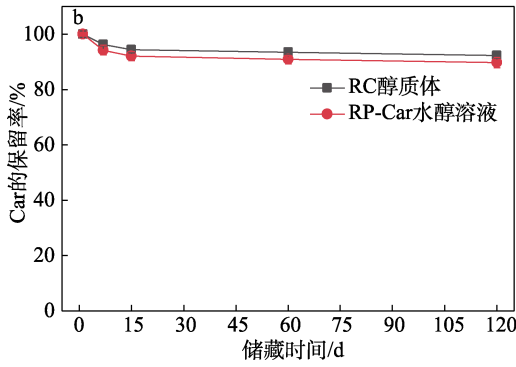
图 5 RC 醇质体在 4、25 和 45 °C 下放置不同时间的粒径变化

Fig. 5 Change of particle size of RC ethosomes at 4, 25 and 45 °C for different time

从图 5 可以看出, RC 醇质体在储藏过程中, 平均粒径始终保持在 70 nm 左右, 说明 RC 醇质体具有较好的储藏稳定性。

图 6 为  $V(\text{乙醇}) : V(\text{PG})=6 : 4$  作为最佳体积比时制备的 RC 醇质体在 25 °C 下的稳定性测试结果。





a—RP 的保留率；b—Car 的保留率

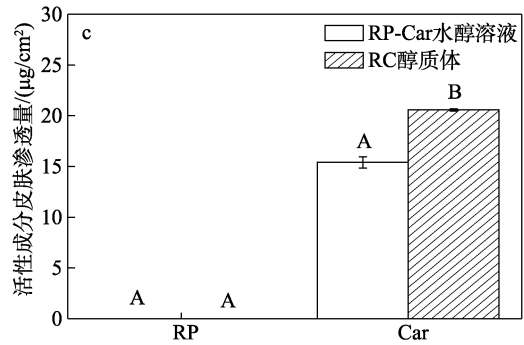
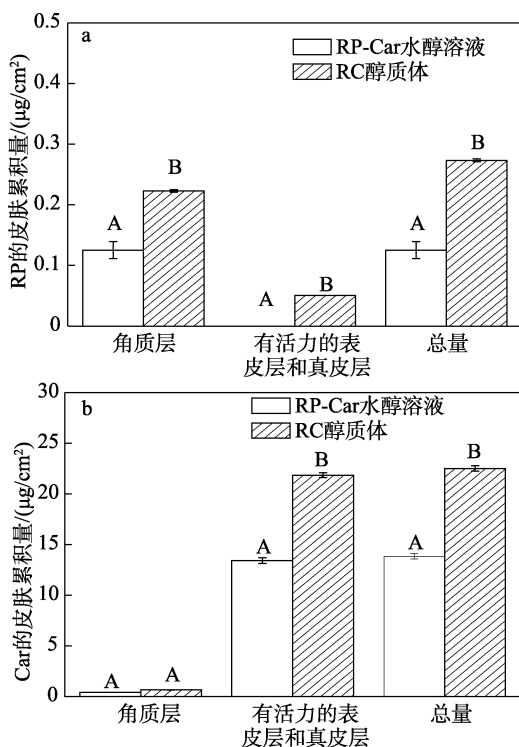
图 6 RC 醇质体和 RP-Car 水醇溶液在 25 °C 下的稳定性  
Fig. 6 Stability of RP ethosome and RP-Car aqueous ethanol solution stored at 25 °C

从图 6 可以看出，储存 120 d，与未加载的 RP-Car 水醇溶液相比，经 RC 醇质体包封后，RP 的保留率显著提升，从 0 提升至 88.70%±4.54% (图 6a)；由于 Car 自身结构比较稳定，因而 Car 的保留率无明显变化，保持在 93.41%±0.83% (图 6b)。

### 2.5 RC 醇质体的体外透皮性能

图 7 为 RP-Car 水醇溶液和 RC 醇质体分别应用于皮肤后皮肤累积量和皮肤渗透量的变化。

从图 7a 可以看出，RP-Car 水醇溶液和 RC 醇质体透皮 12 h 后 RP 的皮肤累积量分别为(0.125±0.014)和(0.273±0.002) μg/cm<sup>2</sup>；从图 7b 可以看出，RP-Car 水醇溶液和 RC 醇质体透皮 12 h 后 Car 的皮肤累积量分别为(13.841±0.274)和(22.521±0.280) μg/cm<sup>2</sup>，表明经 RC 醇质体包载后，RP 和 Car 的皮肤累积量都显著增加。



图中柱状图上 A 和 B 间表示数据具有显著差异 ( $P < 0.05$ )

图 7 不同样品中 RP (a)、Car (b) 的皮肤累积量和 RP、Car 的皮肤渗透量 (c)

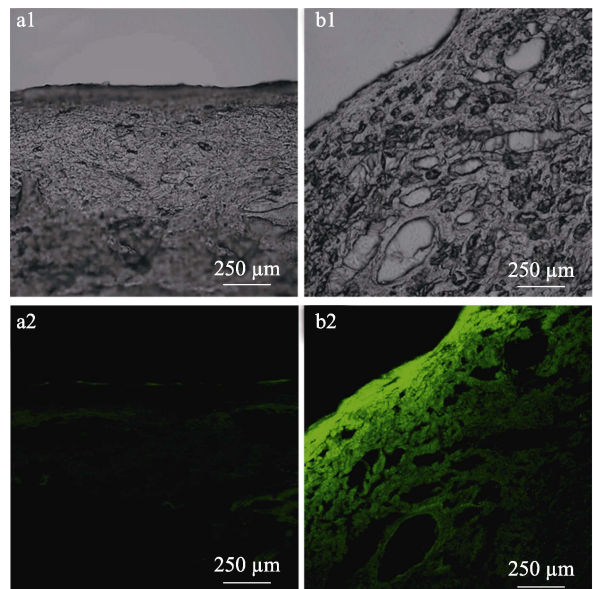
Fig. 7 Skin accumulation of RP (a), Car (b), and skin permeability of RP, Car (c) in different samples

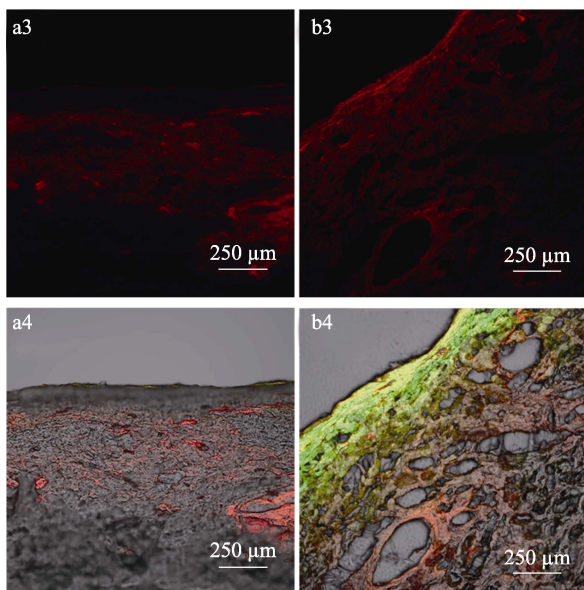
从图 7c 可以看出，包载前后 RP 的皮肤渗透量均为 0，而 Car 的渗透量由(15.400±0.556) μg/cm<sup>2</sup> 提升至(20.559±0.120) μg/cm<sup>2</sup>。

由此可见，RC 醇质体具有较好的皮肤沉积能力，这与前人的研究一致<sup>[4,9]</sup>。这是因为，首先，RC 醇质体具有良好的变形能力和流动性，它可以增强药物对角质层的渗透<sup>[31]</sup>；此外，乙醇可以诱导脂质双分子层中固体和液体脂质的相分离和晶体相变，改变脂质分子的致密排列<sup>[9]</sup>，这会使药物更容易进行皮肤渗透；最后，PG 比乙醇具有更高的黏度和吸湿性，可以增强对水基真皮层的亲和力<sup>[6]</sup>，PG 加入还可以增加囊泡脂质双分子层的微黏度，进而使药物更容易滞留在皮肤中，增加药物在深层皮肤中的积累。因此，脂溶性分子 RP 和水溶性分子 Car 经 RC 醇质体包封后，其皮肤累积量显著提高，且 Car 在皮肤中的渗透量也明显增加。

### 2.6 猪皮的 CLSM 分析

图 8 为猪皮的 CLSM 图像。





a1、b1—明场图；a2、b2—FITC 通道；a3、b3—尼罗红通道；a4、b4—叠加通道

图 8 RP-Car 水醇溶液(a1~a4)和由  $V(\text{乙醇}) : V(\text{PG})=6 : 4$  制备的 RC 醇质体 (b1~b4) 处理后猪皮横截面的 CLSM 图像

Fig. 8 CLSM images of cross sections of pig skin treated with RP-Car aqueous alcohol solution (a1~a4) and RC ethosomes prepared with  $V(\text{ethanol}) : V(\text{PG})=6 : 4$  (b1~b4)

从图 8 可以看出, 与 RP-Car 水醇溶液相比, RC 醇质体中的脂溶性分子标记物(尼罗红)和水溶性分子标记物(FITC)在皮肤中的荧光强度和透皮深度均显著增加。由此可推测, RC 醇质体中脂溶性活性物分子 RP 和水溶性活性物分子 Car 的透皮含量和透皮深度也有可能增加, 与 2.5 节中测得的 RP 和 Car 的透皮结果一致, 由此说明, RC 醇质体会增加脂溶性和水溶性活性物的透皮含量。

### 3 结论

采用乙醇/PG 混合溶剂构建了神经酰胺修饰的二元醇质体(RC 醇质体)。

(1) 由  $V(\text{乙醇}) : V(\text{PG})=6 : 4$  制备的 RC 醇质体平均粒径约为 70 nm 的球形囊泡, 其 RP 的包封率为  $80.28\% \pm 0.10\%$ , Car 的包封率  $47.20\% \pm 0.71\%$ , 包封率较高。

(2) 该 RC 醇质体在储藏 120 d 过程中, 平均粒径始终保持在 70 nm 左右, 具有较好的储藏稳定性。

(3) 乙醇和 PG 的有效组合能够提高 RC 醇质体中脂溶性分子 RP 和水溶性分子 Car 在皮肤中的累积量, 同时提升 Car 在皮肤中的渗透量。

本文未对 RC 醇质体的透皮机制进行探究, 这将是此后进一步研究的内容。

### 参考文献:

- [1] PU Y F (蒲云峰), ZHANG W M (张伟敏), ZHONG G (钟耕). Application and function of ceramide[J]. *Cereals & Oils (粮食与油脂)*, 2005(7): 14-16.
- [2] HYEON T I, YOON K S. Skin absorption and physical property of ceramide-added ethosome[J]. *Journal of the Korean Applied Science and Technology*, 2021, 38(3): 801-812.
- [3] JIA L P (贾利萍), YANG C (杨成), LIANG R (梁蓉). Preparation and characterization of ceramide modified ethosomes[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology (食品与生物技术学报)*, 2023, 42(4): 48-56.
- [4] ZHANG J P, WEI Y H, ZHOU Y, *et al.* Ethosomes, binary ethosomes and transfersomes of terbinafine hydrochloride: A comparative study[J]. *Archives of Pharmacol Research*, 2012, 35(1): 109-117.
- [5] LIANG W D (梁文迪), JIA J J (贾佳佳), DAI Y H (代英辉), *et al.* Progress in the study of alcohols as drug carriers in transdermal drug delivery systems[J]. *Chinese Journal of Pharmaceutics (中国药理学杂志)*, 2022, 20(3): 89-95.
- [6] ELSAYED M M A, ABDALLAH O Y, NAGGAR V F, *et al.* PG-liposomes: Novel lipid vesicles for skin delivery of drugs[J]. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2007, 59(10): 1447-1450.
- [7] HIWALE S P, HATWAR P P, SANAP G S, *et al.* A review on formulation and evaluation of transdermal ethosomes[J]. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 2022, 11(3): 2034-2045.
- [8] XING W S (邢文善), LU F (路芳), XU Y (徐阳). Progress in the study of novel liposome-binary ethosomes for percutaneous administration [J]. *Chinese Journal of Medicinal Guide (中国医药导刊)*, 2018, 20(4): 221-224.
- [9] SHEN L N, ZHANG Y T, WANG Q, *et al.* Enhanced *in vitro* and *in vivo* skin deposition of apigenin delivered using ethosomes[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2014, 460(1/2): 280-288.
- [10] CHOURASIA M K, KANG L, CHAN S Y. Nanosized ethosomes bearing ketoprofen for improved transdermal delivery[J]. *Results in Pharma Sciences*, 2011, 1(1): 60-67.
- [11] PAOLINO D, CELIA C, TRAPASSO E, *et al.* Paclitaxel-loaded ethosomes®: Potential treatment of squamous cell carcinoma, a malignant transformation of actinic keratoses[J]. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2012, 81(1): 102-112.
- [12] CADDEO C, SALES O D, VALENTI D, *et al.* Inhibition of skin inflammation in mice by diclofenac in vesicular carriers: Liposomes, ethosomes and PEVs[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2013, 443(1/2): 128-136.
- [13] GHANBARZADEH S, ARAMI S. Enhanced transdermal delivery of diclofenac sodium *via* conventional liposomes, ethosomes, and transfersomes[J]. *BioMed Research International*, 2013, 2013: 616810.
- [14] MARTO J, VITOR C, GUERREIRO A, *et al.* Ethosomes for enhanced skin delivery of griseofulvin[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2016, 146: 616-623.
- [15] IIZHAR S A, SYED I A, SATAR R, *et al.* *In vitro* assessment of pharmaceutical potential of ethosomes entrapped with terbinafine hydrochloride[J]. *Journal of Advanced Research*, 2016, 7(3): 453-461.
- [16] LIN H M, LIN L F, CHOI Y, *et al.* Development and *in-vitro* evaluation of co-loaded berberine chloride and evodiamine ethosomes for treatment of melanoma[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2020, 581: 119278.
- [17] GUO T, LU J Y, FAN Y L, *et al.* TPGS assists the percutaneous administration of curcumin and glycyrrhetic acid coloaded functionalized ethosomes for the synergistic treatment of psoriasis[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2021, 604(15): 120762.
- [18] ZHAO B Y (赵冰怡), CONG L (丛琳), LI X Z (李雪竹). Research on the application of retinol and retinol esters in cosmetics[J]. *Modern Chemical Research (当代化工研究)*, 2020, 71(18): 112-116.
- [19] ROUSSELLE C. Opinion of the scientific committee on consumer safety (SCCS)-final version of the opinion on vitamin A (retinol, retinyl acetate and retinyl palmitate) in cosmetic products[J]. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2016, 84: 102-104.
- [20] QUINN P J, BOLDYREV A A, FORMAZUYK V E. Carnosine: Its properties, functions and potential therapeutic applications[J]. *Molecular Aspects of Medicine*, 1992, 13(5): 379-444.