

包封重组人源Ⅲ型胶原蛋白甘油体的制备及性能

曾宇蓉^{1,2}, 梁 蓉^{1,2*}, 杨 成^{1,2}

(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: 为提高重组人源Ⅲ型胶原蛋白(RHC)经皮递送性能, 采用大豆卵磷脂(简称磷脂)、甘油、吐温 80 构建了甘油体, 然后对 RHC 进行包封, 制备了包载 RHC 的甘油体(RHC 甘油体), 并建立了 Folch 结合体积排除色谱法(Folch-HPLC 法)用于检测 RHC 包封率。通过多角度粒度及高灵敏 Zeta 电位分析仪, 考察了甘油和吐温 80 质量浓度对 RHC 甘油体的粒径和多分散性指数(PDI)的影响。通过荧光探针探究了甘油、吐温 80 质量浓度对 RHC 甘油体微黏度的影响及其稳定机理。结合激光共聚焦显微镜(CLSM)测试, 评价了 RHC 甘油体的透皮性能。采用鸡胚绒毛尿囊膜实验评估了 RHC 甘油体的刺激性。结果表明, Folch-HPLC 法能够完全去除磷脂的干扰, 有效保留 RHC, 且 RHC 的提取回收率为 $100.44\% \pm 0.84\%$ 。当磷脂质量浓度 150 g/L、RHC 质量浓度 2 g/L、甘油质量浓度 250 g/L、吐温 80 质量浓度 25 g/L 时, 制备的 RHC 甘油体为黄色澄清透明液体, 稳定性最好, 平均粒径为 (92.34 ± 1.22) nm, 多分散性指数为 0.233 ± 0.01 , 包封率为 $12.78\% \pm 0.13\%$ 。与 RHC 的磷酸盐缓冲液相比, RHC 甘油体具有更强的皮肤渗透性, 能够有效促进 RHC 的经皮递送, 并表现出对鸡胚绒毛尿囊膜的无刺激性。

关键词: 重组人源Ⅲ型胶原蛋白; 甘油体; 包封率; Folch 法; HPLC; 透皮性能; 医药原料

中图分类号: TQ658 文献标识码: A 文章编号: 1003-5214(2026)05-1103-09

Preparation and performance of glycerosomes with encapsulated recombinant human collagenⅢ

ZENG Yurong^{1,2}, LIANG Rong^{1,2*}, YANG Cheng^{1,2}

(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: To enhance the transdermal delivery performance of recombinant human collagen Ⅲ (RHC), glycerosomes were constructed from soybean lecithin (for short lecithin), glycerol and Tween 80, and subsequently used for encapsulation of RHC to form RHC-loaded glycerosomes (RHC glycerosomes). A Folch-based high-performance liquid chromatography method (Folch-HPLC method) combining the Folch extraction protocol with size exclusion chromatography was established to measure the RHC encapsulation efficiency. The effects of glycerol and Tween 80 mass concentrations on the particle size and polydispersity index (PDI) of RHC glycerosomes were investigated by multi-angle particle size and high sensitivity Zeta potential analyzer, while the influence of glycerol and Tween 80 mass concentration on the micro-viscosity and stabilization mechanism of RHC glycerosomes was explored *via* fluorescence probe analysis. The transdermal delivery capability of RHC glycerosomes was evaluated by confocal laser scanning microscopy (CLSM), with its irritancy assessed by chorioallantoic membrane assay in chicken embryos. The results demonstrated that the Folch-HPLC method effectively removed interference from lecithin while retained the RHC, achieving an RHC recovery rate of $100.44\% \pm 0.84\%$. Under the conditions of lecithin mass concentration 150 g/L, RHC mass concentration 2 g/L, glycerol mass concentration 250 g/L, and Tween 80

收稿日期: 2025-02-28; 定用日期: 2025-03-24; DOI: 10.13550/j.jxhg.20250137

基金项目: 国家重点研发计划项目(2016YFD0400801)

作者简介: 曾宇蓉(1996—), 女, 硕士生, E-mail: zengyurong2022@163.com。联系人: 梁 蓉(1983—), 副教授, E-mail: rongliang@jiangnan.edu.cn。

mass concentration 25 g/L, the prepared RHC glycosomes appeared as a yellow, clear, and transparent solution, showed the best stability, displayed a particle size of (92.34 ± 1.22) nm, a PDI of 0.233 ± 0.01 and an encapsulation efficiency of $12.78\% \pm 0.13\%$. Compared with RHC solution (phosphate buffer solution as solvent), RHC glycosomes exhibited significantly enhanced skin penetration, effectively promoted the transdermal delivery of RHC, and showed no irritation in chorioallantoic membrane.

Key words: recombinant human collagen III; glycosomes; encapsulation efficiency; Folch method; HPLC; transdermal delivery; drug materials

重组人源Ⅲ型胶原蛋白(RHC)是通过DNA重组技术获得的生物原料^[1],其氨基酸序列与天然胶原蛋白保持高度同源性,已在化妆品领域展现出促进胶原再生^[2]、修复创伤^[3]、延缓衰老^[4]、增强皮肤弹性^[5]等多重生物活性。然而,RHC固有的酶敏感性、热不稳定性及透皮吸收屏障等缺陷严重限制了其生物利用度^[6]。因此,需要采用制剂学的手段以增强其经皮递送效率。

目前,主要采用凝胶^[7]、乳液^[8]以及脂质体^[1,6,9]对胶原蛋白进行包载,其中,脂质体因与皮肤组织在化学组分和微结构层面的高度匹配特性而受到了广泛关注^[10]。甘油体是通过在常规脂质载体中掺入高含量(体积分数,10%~50%)的甘油改良而成的新型递送体系,该体系不仅具备优异的保湿性能,可有效提升表皮水分含量^[11],还展现出独特的透皮增效机制。MANCA等^[12]研究发现,甘油分子与磷脂极性端具有显著结合效应,前者能够发挥结构调节剂的作用——通过增强双分子层形变能力,显著降低脂质膜结构的刚性。这种动态柔韧性的提升使改良后的载体更易克服角质层的物理阻隔,穿透皮肤屏障,从而大幅提高活性成分的生物利用度。包封率是检测脂质体性质的重要参数,其测定通常需要对载体与游离药物有效分离,以检测包封药物或游离药物的含量。RHC含量检测的常用方法包括凯氏定氮法^[13]、羟脯氨酸比色法^[14]、BCA法^[6,9]、荧光标记法^[15]及体积排阻高效液相色谱法(SE-HPLC)^[16]。常用的分离方法主要有超速离心法、透析法、超滤膜过滤法等^[17]。然而,上述分离方法都无法完全将磷脂分离,严重干扰定量分析:凯氏定氮法无法区分非蛋白氮;重组胶原体系因羟脯氨酸缺失影响比色法适用性^[18];磷脂基质效应显著干扰BCA显色^[6];荧光标记法在复杂体系中稳定性差^[19];紫外吸收峰重叠阻碍SE-HPLC检测。Folch法是脂质萃取的经典方法,其使用氯仿/甲醇(体积比2:1)作为提取溶剂,通过极性差异选择性溶解磷脂,从而将其分离^[20],具有特异性强、适用性广、提取效率高等特性。

本文拟将Folch法与HPLC结合(Folch-HPLC)去除磷脂,高保留RHC,实现对RHC的准确定量。

并在此基础上考察甘油、吐温80质量浓度对RHC甘油体的稳定性和微黏度的影响,最终对甘油体的透皮性能进行研究,以期对胶原蛋白甘油体的构建提供一定的科学依据。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

重组人源Ⅲ型胶原蛋白(粉末状),江苏创健医疗科技股份有限公司;卵磷脂,河北美业斯维生物技术有限公司;甲醇、异硫氰酸荧光素(FITC),AR,乙腈(色谱级),上海泰坦科技有限公司;1,6-二苯基-1,3,5-己三烯(DPH)、1,6-二苯基-1,3,5-己三烯-4'-甲苯磺酸三甲基铵(TMA-DPH),AR,美国Sigma公司;OCT冰冻切片包埋剂,BR,美国Sakura公司;磷酸盐缓冲液(PBS,10 mol/L,pH=7.4)速溶颗粒,NaHCO₃、Na₂CO₃、二甲基亚砜(DMSO)、NaCl、四氢呋喃(THF)、吐温80、甘油、二氯甲烷、NaOH,AR,国药集团化学试剂有限公司。

Centrifuge 5418 R型离心机,德国Eppendorf公司;UV-1800双光束紫外-可见分光光度计(UV-Vis),上海美谱达仪器有限公司;Ultimate 3000型超高效液相色谱仪(HPLC),美国Thermo Fisher Scientific公司;Gsonica Q700型超声波破碎仪,美国Gsonica公司;NanoBrook Omni型多角度粒度与高灵敏Zeta电位分析仪,美国布鲁克海文仪器公司;F-7000型荧光分光光度计,日本Hitachi公司;TK-12D型透皮仪,上海锴凯公司;TCS SP8型激光扫描共聚焦显微镜(CLSM),德国Leica公司。

1.2 方法

1.2.1 空白甘油体的制备

参照文献[12,21]方法并稍作修改,采用水合超声法制备甘油体。将2.50 g甘油、0.25 g吐温80溶于PBS得到水相;然后,分别将0.10 g和2.00 g的大豆卵磷脂缓慢均匀地加入到水相中,体系总质量为10.00 g。室温下搅拌至水化完全,得到悬浊液;最后,用超声波破碎仪进行探头超声处理(振幅50,探头7 mm,3 s开/3 s关,循环60次),得到低质量浓度空白甘油体和高质量浓度空白甘油体。

1.2.2 胶原蛋白甘油体的制备

按照 1.2.1 节方法和步骤,将 2.50 g 甘油、0.25 g 吐温 80 加入到 PBS 中;然后,分别加入 0.01、0.02、0.03、0.04、0.05 g RHC 粉末;再将 2.00 g 大豆卵磷脂缓慢均匀地加入到体系中,体系总质量为 10.00 g (体系总体积为 10 mL,下同);随后,进行搅拌水化和探头超声处理,制备包载不同质量 RHC 的甘油体,用于 HPLC 考察回收率。

按照 1.2.1 节方法和步骤,将 2.50 g 甘油、0.25 g 吐温 80 加入到 PBS 中,固定 RHC 质量浓度为 1 g/L;然后,分别加入 0.10、0.50、1.00、1.50、2.00 g 大豆卵磷脂;随后,进行搅拌水化和探头超声处理,制备包载质量浓度为 1 g/L 的不同大豆卵磷脂(简称磷脂)质量浓度的 RHC 的甘油体,用于 HPLC 考察回收率。

按照 1.2.1 节方法和步骤,固定磷脂质量浓度 150 g/L、RHC 质量浓度为 2 g/L,分别加入 0、0.50、1.50、2.50、3.50 g 甘油,制备不同大豆卵质量浓度甘油的 RHC 甘油体,用于考察甘油质量浓度对 RHC 甘油体的影响。

按照 1.2.1 节方法和步骤,固定大豆卵磷脂质量浓度 150 g/L、RHC 质量浓度为 2 g/L,分别加入 0、0.05、0.15、0.25、0.35 g 吐温 80,制备不同质量浓度吐温 80 的 RHC 甘油体,用于考察吐温 80 质量浓度对 RHC 甘油体的影响。

1.2.3 荧光标记胶原蛋白甘油体的制备

参考文献[9,16]方法并稍作修改,将 7.60 g NaHCO_3 、1.06 g Na_2CO_3 、7.36 g NaCl 用纯水溶解后,加入到 1 L 容量瓶中,用纯水定容,配制成 pH=9.0 浓度 0.1 mol/L 的碳酸盐缓冲液(CB)。分别配制质量浓度为 1 g/L 的 FITC 的 DMSO 溶液和质量浓度 10 g/L 的 RHC 的 CB 溶液,再按体积比 1:1 混合后,室温、避光、搅拌反应 5 h;然后,将反应液转移至透析袋(截留相对分子质量 3500 Da)中,用 PBS 透析至透析液澄清无色后,更换纯水透析 2~3 次;最后,将反应液取出,在 -50 °C 下冷冻干燥 48 h,得到荧光标记胶原蛋白固体粉末,记为 FITC-RHC。

按照 1.2.2 节方法和步骤,在调整水相制备过程中,加入 2 mg RHC-FITC,制备包载 FITC-RHC 的甘油体。

1.2.4 Folch 法去除甘油体中的磷脂

参考文献[22]方法并稍作修改。分别吸取 450 μL 按照 1.2.1 节和 1.2.2 节制得的磷脂质量浓度为 200 g/L 的空白甘油体和包封质量浓度 1 g/L RHC 的 RHC 甘油体,随后加入 950 μL 二氯甲烷/甲醇(体积比 2:1)溶剂,经涡旋混合确保样品充分与萃取剂反应后,进行室温离心(5000 r/min, 15 min),弃

去下层磷脂与二氯甲烷相,收集上清液,再次加入二氯甲烷,重复 3 次确保上层完全去除磷脂后,吸出上清液后用纯水定容至 1 mL,留待后续 UV 和 HPLC 分析。

根据式(1)计算 RHC 回收率(%)^[23]:

$$\text{回收率}/\% = m_1/m_0 \times 100 \quad (1)$$

式中: m_0 和 m_1 分别为 RHC 原始加入质量和提取检测质量, mg。

1.2.5 包封率的检测

参考文献[2]方法测定 RHC 包封率,并稍作修改。将 1 mL 不同 RHC 甘油体样品加入到透析袋(截留相对分子质量 300 kDa)后用塑料夹夹紧,放入 100 mL PBS 中,在 25 °C、600 r/min 下不換水透析 12 h,以分离游离的 RHC;随后,取出透析后的 RHC 甘油体样品,以及吸取等量的未透析的 RHC 甘油体原液, Folch 法将磷脂去除后, HPLC 检测 RHC 含量。根据式(2)计算包封率(%):

$$\text{包封率}/\% = m_1/m_0 \times 100 \quad (2)$$

式中: m_0 和 m_1 分别为原液中和透析后测得的 RHC 质量, mg。

1.3 结构表征与性能测试

1.3.1 微黏度测定

参考文献[24]方法并适当修改。采用 DPH 与 TMA-DPH 双探针体系进行膜特性表征,前者特异性嵌入磷脂双层的疏水核心,后者选择性锚定于脂-水界面区,通过测定两者的荧光偏振差异(各向异性值),可精确定量不同膜区域的微黏度分布特征。

准确称取 DPH,配制浓度 2×10^{-3} mol/L 的 DPH-THF 母液。将不同甘油体样品稀释 50 倍后,取 5 mL 与 0.1 mL DPH-THF 母液混合,轻摇混匀后在 25 °C 下避光水浴平衡 30 min。检测时采用荧光分光光度计,分别设置 DPH(激发波长 358 nm,发射波长 425 nm)与 TMA-DPH(激发波长 365 nm,发射波长 430 nm)的检测参数,狭缝均为 5 nm。

实验操作分两步完成偏振数据采集:首先,设置仪器为垂直偏振模式,分别记录样品在角度为(0, 0)和(0, 90)下的荧光强度,分别记为 $I_{0,0}$ 与 $I_{0,90}$;随后,切换仪器至水平偏振模式,设置角度为(90, 0)和(90, 90),获取荧光强度并记为 $I_{90,0}$ 及 $I_{90,90}$;最后根据式(3)~(5)进行微黏度(η , a.u.)计算:

$$\eta = 2P/(0.46 - P) \quad (3)$$

$$P = (I_{0,0} - G \times I_{0,90}) / (I_{0,0} + G \times I_{0,90}) \quad (4)$$

$$G = I_{90,90} / I_{90,0} \quad (5)$$

式中: G 为仪器光栅校正系数; P 为荧光偏振度。

1.3.2 CLSM 测定

参考文献[25]方法并修改。取透皮后的皮肤组织进行冷冻包埋,制备 20 μm 厚切片,在激发波长 488 nm、倍镜 10 $\times$ 下通过 CLSM 成像系统观察荧光

分布, 并采用 ImageJ 软件计算荧光强度。

1.3.3 UV-Vis 吸收光谱测试

吸取适量低质量浓度 (10 g/L) 和质量浓度 (200 g/L) 磷脂制备的空白甘油体, 采用 UV-Vis 进行光谱扫描, 考察不同样品在波长 190~600 nm 处的吸光度。

1.3.4 HPLC 测定

取高质量浓度磷脂所制得的空白甘油体和 RHC 甘油体样品, 用体积分数 60% 的甲醇破乳或 Folch 法去除磷脂后通过 220 μm 有机滤膜过滤并进行 HPLC 检测: Thermo SEC-1000 色谱柱 (4.6 mm $\times$ 300 mm $\times$ 7 μm), 流动相 $V(\text{乙腈}): V(\text{PBS})=20:80$, 流速 0.1 mL/min, 柱温 35 $^{\circ}\text{C}$, 进样量 1 μL , 每个样品重复平行进样 3 次。

1.3.5 粒径与多分散性指数 (PDI) 测定

将 RHC 甘油体样品用去离子水稀释 10 倍, 使用多角度粒度与高灵敏 Zeta 电位分析仪对 RHC 甘油体的粒径及 PDI 进行测定: 散射角 90 $^{\circ}$, 温度 25 $^{\circ}\text{C}$, 每个样品平行测定 3 次, 结果取算数平均值。

1.4 体外透皮实验

参照文献[24]方法并稍作修改。将冷冻保存的巴马香猪皮肤样本室温解冻后, 修剪成适配 Franz 扩散池的圆形切片并固定于渗透装置中。供给池注入 2 mL 待测样品后密封处理, 接收池注入 7.5 mL PBS, 设定恒温水浴 (37 $^{\circ}\text{C}$)、匀速搅拌 (200 r/min) 及 24 h 渗透时长, 每组实验设置 3 个平行样本。

透皮完成后, 取出猪皮, 用去离子水缓慢少量冲洗以除去表面残余样品, 再使用滤纸将猪皮表面水分吸干, 留待后续表征。

1.5 刺激性测试

参照文献[26]方法, 将受精鸡胚于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度 70% 环境中培养, 每日奇数次翻转气室方向。孵育至 9 d 后, 照蛋确认气室位置并标记, 用尖嘴镊剥离标记区蛋壳显露白色蛋膜; 随后, 用质量分数 0.9% 的生理盐水润湿蛋膜后并吸除多余液体, 精细剥离内膜确保血管膜完整并放置加样环; 最后, 将 100 μL 样品均匀滴覆尿囊膜表面加样环中, 分别记录 5 min 内出血、凝血、溶血现象出现的时间并拍照。

1.6 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“算术平均值 $\pm$ 标准偏差”表示, 所有实验至少重复 3 次 ($P<0.05$)。

2 结果与讨论

2.1 Folch 法对甘油体中磷脂的去除效果分析

2.1.1 UV-Vis 吸收光谱分析

对 1.2.1 节制备的空白甘油体进行 Folch 法操作

后样品的实物外观、去除磷脂 3 次后甘油体 UV-Vis 吸收光谱进行考察, 结果如图 1 所示。其中, 样品 1 为低质量浓度空白甘油体去除磷脂 1 次后; 样品 2 为高质量浓度空白甘油体去除磷脂 1 次后; 样品 3 为低质量浓度空白甘油体去除磷脂 3 次后; 样品 4 为高质量浓度空白甘油体去除磷脂 3 次后。

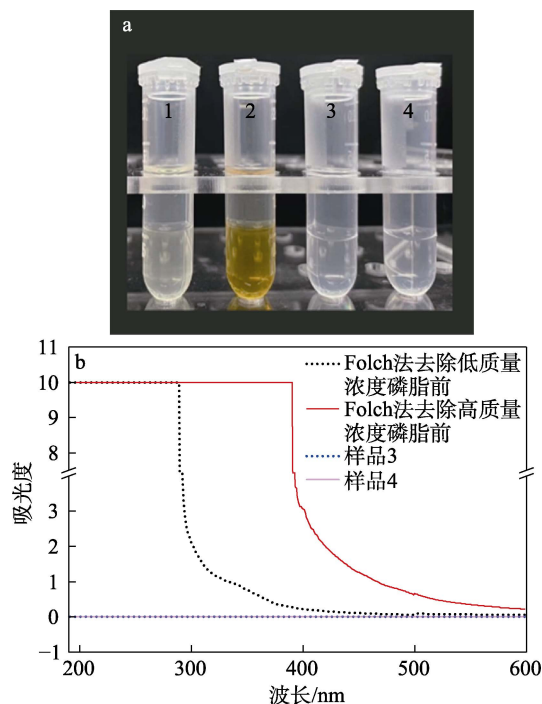


图 1 Folch 法对样品外观 (a) 和 UV-Vis 吸收光谱 (b) 的影响

Fig. 1 Effect of Folch method on appearance (a) and UV-Vis absorption spectra (b) of samples

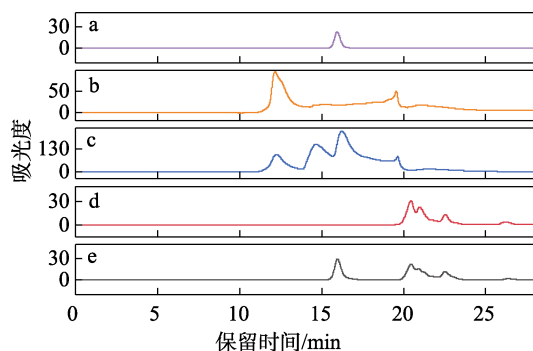
从图 1a 可以看出, 样品 1 和样品 2 的上层为包含 RHC 的水-甲醇相, 下层为二氯甲烷相, 其中样品 2 中磷脂含量变大, 颜色明显呈黄色, 溶于二氯甲烷中。经过 3 次萃取后, 下层含磷脂的有机相均明显变得澄清透明, 磷脂的颜色已肉眼不可见 (样品 3 和样品 4), 表明磷脂已有效去除。

从图 1b 可以看出, Folch 法去除低、高质量浓度磷脂前, 样品在 190~600 nm 处都有紫外吸收, 且峰型分布广, 吸光度已达检测上限。样品 4 仍未出现吸收, 表明 Folch 法能够高效去除磷脂, 通过 3 次萃取, 已完全去除甘油体中的磷脂。

2.1.2 HPLC 分析

图 2 为质量浓度为 1 g/L 的 RHC-PBS 溶液、高质量浓度磷空白甘油体和质量浓度 1 g/L 的 RHC 的 RHC 甘油体分别经体积分数 60% 的甲醇水溶液破乳、Folch 法萃取后的 HPLC 谱图。

从图 2a 可以看出, RHC-PBS 溶液在 15.95 min 附近出现最大吸收峰, 且峰型干净、尖锐, 对称性良好。



a—质量浓度为 1 g/L 的 RHC-PBS 溶液; b—高质量浓度空白甘油体经体积分数 60% 的甲醇水溶液破乳后; c—RHC 质量浓度为 1 g/L 的 RHC 甘油体经体积分数 60% 的甲醇水溶液破乳后; d—高质量浓度空白甘油体经 Folch 法萃取后; e—RHC 质量浓度为 1 g/L 的 RHC 甘油体经 Folch 法萃取后

图 2 Folch 法对甘油体 HPLC 谱图的影响

Fig. 2 Effect of Folch method on chromatograph of HPLC detection of glycosomes

从图 2b、c 可以看出,甘油体未经 Folch 法去除磷脂时,破乳后的甘油体壁材和 RHC 的吸收峰重叠,无法分离。

从图 2d、e 可以看出,通过 Folch 法处理后,甘油体壁材的吸收峰已成功与 RHC 分离,仅完全保留 RHC 的特征吸收峰,且其峰形清晰、对称性良好,能够用于 RHC 的准确定量分析。这也与 UV-Vis 测试的结果一致。

综上,Folch 法能够有效去除甘油体中的中性磷脂,这与 CEQUIER-SÁNCHEZ 等^[22]的研究结果一致,即对于中性磷脂,非极性溶剂二氯甲烷能够将其大量溶解,甲醇与二氯甲烷具有协同溶剂效应^[27],进一步促进了磷脂在下层的分配。因此,通过 Folch 法能够将磷脂完全去除。

2.2 RHC 质量浓度对甘油体中 RHC 回收率的影响

图 3 为 RHC 质量浓度对甘油体磷脂(质量浓度 200 g/L)中 Folch 法处理后 RHC 回收率的影响。

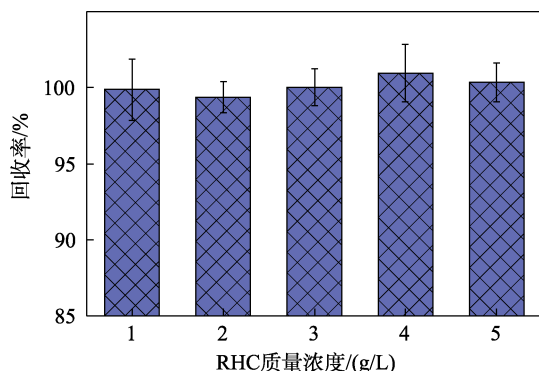


图 3 RHC 质量浓度对 Folch 法处理后 RHC 回收率的影响

Fig. 3 Effect of RHC mass concentration on recovery of RHC after Folch method treatment

从图 3 可以看出,随着甘油体中 RHC 质量浓度

的增加,RHC 始终保持稳定的回收率(平均 $100.11\% \pm 1.13\%$),且去除磷脂的过程中未观察到 RHC 沉淀析出,峰形未发生变化。这可能是因为,Folch 法未对 RHC 造成变性,或者导致了变性但未生成沉淀,这与郝少莉等^[28]的研究结果一致,即蛋白质产生变性沉淀还与体系因素密切相关^[29]。结果表明,Folch 法在不同质量浓度的 RHC 制备的甘油体检测中始终保持较高的回收率。

2.3 磷脂质量浓度对甘油体中 RHC 回收率的影响

图 4 为磷脂质量浓度对 Folch 法处理后的 RHC 回收率的影响。

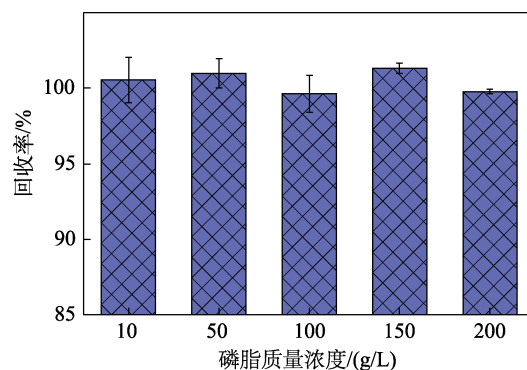


图 4 磷脂质量浓度对 Folch 法处理后 RHC 回收率的影响

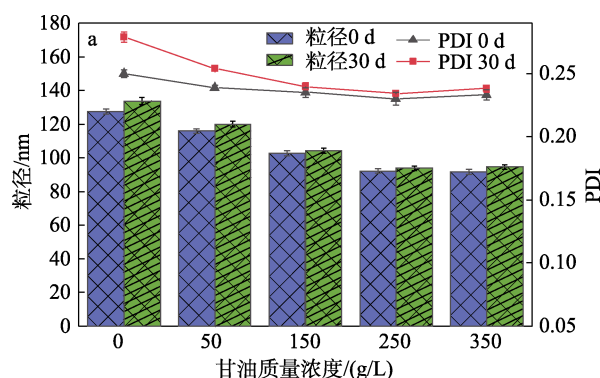
Fig. 4 Effect of lecithin mass concentration on recovery of RHC after Folch treatment

从图 4 可以看出,随着磷脂质量浓度的增大,Folch 法处理后 RHC 回收率仍保持在 $100.44\% \pm 0.84\%$ 。表明对于高质量浓度磷脂配方,Folch 法经过 3 次提取已可完全特异性去除磷脂,解决了磷脂带来的干扰;同时仍能够通过 HPLC 准确、有效地检测 RHC 的含量。这也与之前 UV-Vis 和 HPLC 测试结果一致。

综上,对于不同配方的 RHC 甘油体,Folch 法能够在完全去除磷脂干扰的基础上,同时实现对 RHC 的高效保留,可用于对 RHC 甘油体包封率的准确检测。

2.4 甘油质量浓度对 RHC 甘油体的影响

图 5 为甘油质量浓度对甘油体粒径、PDI 和包封率的影响。



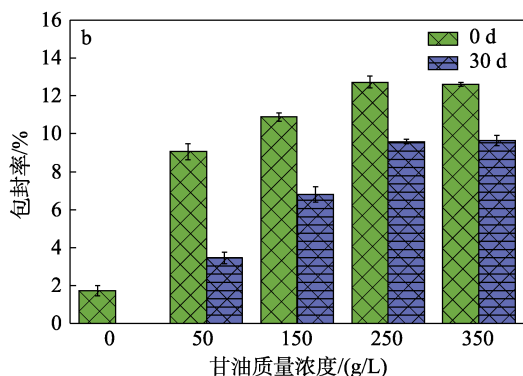


图 5 甘油质量浓度对甘油体粒径、PDI (a) 和包封率 (b) 的影响

Fig. 5 Effect of glycerol mass concentration on RHC glycosomes particle size, PDI (a) and encapsulation efficiency (b)

从图 5 可以看出,当甘油质量浓度为 0~250 g/L 时,随着甘油质量浓度的增大,甘油体的粒径和 PDI 逐渐减小(图 5a),包封率逐渐增大(图 5b)。当甘油质量浓度为 250 g/L 时,甘油体的粒径(92.25 ± 1.39) nm 和 PDI (0.230 ± 0.005) 均达到最小,包封率最高,为 $12.73\% \pm 0.32\%$,继续增大甘油浓度则不再有明显效果,表明甘油浓度已经达到饱和。将样品在 4 °C 下放置 30 d,发现此质量浓度下的甘油体仍具有最好的稳定性。结果表明,增大甘油质量浓度能够有效降低甘油体粒径、PDI 并增大包封率,这也与张雅琪^[11]的研究结果一致。

作为关键参数之一,膜流动性与甘油体稳定性呈现显著负相关性,即微黏度的升高意味着甘油体结构的稳定性增强^[25]。图 6 为甘油质量浓度对甘油体微黏度的影响。

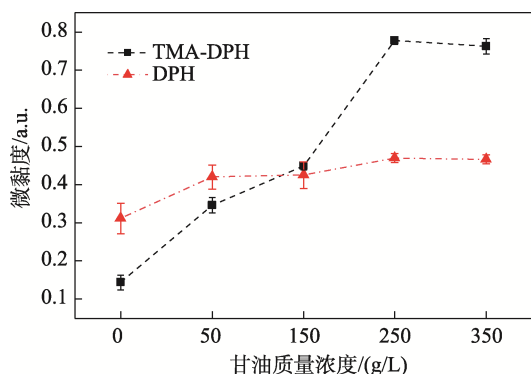


图 6 甘油质量浓度对甘油体微黏度的影响

Fig. 6 Effect of glycerol mass concentration on microviscosity of glycosomes

从图 6 可以看出,随着甘油质量浓度的增大,甘油体的微黏度逐渐增加,流动性降低,甘油体稳定性增强。当甘油质量浓度为 250 g/L 时,微黏度达到最大 [TMA-DPH 为 (0.838 ± 0.023) a.u., DPH 为 (0.469 ± 0.012) a.u.]。继续增大甘油质量浓度,微黏

度不再增大。这是因为,甘油和磷脂具有相互作用,增大甘油质量浓度导致磷脂极性头基振动幅度减弱,酰基链纵向排列密度增加,头基空间位阻减小,同时伴随甘油体粒径减小,甘油体稳定性和包封率提高。这也与其稳定性结果一致。

2.5 吐温 80 质量浓度对甘油体的影响

图 7 为吐温 80 质量浓度对甘油体粒径、PDI 和包封率的影响。

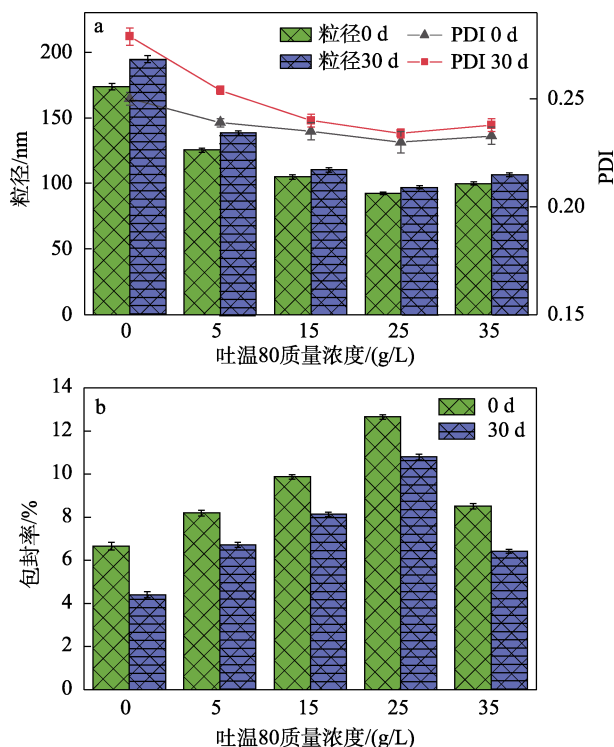


图 7 吐温 80 质量浓度对 RHC 甘油体粒径、PDI (a) 和包封率 (b) 的影响

Fig. 7 Effect of Tween 80 mass concentration on particle size, PDI (a) and encapsulation efficiency (b) of RHC glycosomes

从图 7 可以看出,当温 80 质量浓度为 0~25 g/L 时,随着吐温 80 质量浓度的增大,RHC 甘油体粒径、PDI 逐渐减小,包封率逐渐增大。当吐温 80 质量浓度为 25 g/L 时,RHC 甘油体粒径 [(92.53 ± 1.03) nm] 和 PDI (0.242 ± 0.004) 达到最小,包封率最高 ($12.66\% \pm 0.11\%$)。继续增大吐温 80 质量浓度,粒径和 PDI 开始增大,包封率下降,这也与常振刚等^[30]的研究结果一致。

图 8 为吐温 80 质量浓度对甘油体微黏度的影响。

从图 8 可以看出,随着吐温 80 质量浓度的增大,RHC 甘油体微黏度先增大后降低。当吐温 80 质量浓度为 25 g/L 时,RHC 甘油体微黏度最大 [TMA-DPH 为 (0.778 ± 0.001) a.u., DPH 为 (1.101 ± 0.035) a.u.],稳定性最强。这可能是因为,吐温 80 是一种非离子表面活性剂,一方面能够增加磷脂溶解度;另一方

面其疏水性长链可以插入甘油体双层膜, 而亲水端则在甘油体表面延伸, 形成亲水层, 使稳定性增强, 从而使甘油体的结构变得柔软疏松, 利于药物载入。但添加过量时, 吐温 80 胶束逐渐与磷脂增溶, 形成混合胶团, 造成 RHC 甘油体泄漏, 导致稳定性和包封率下降^[30]。

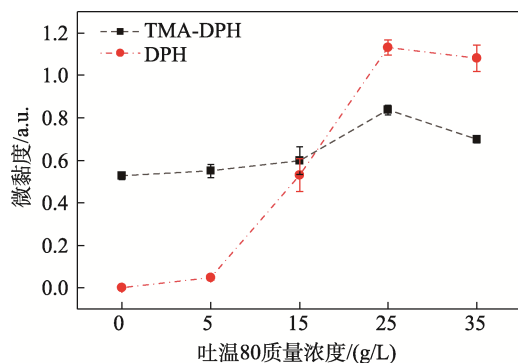


图8 吐温 80 质量浓度对 RHC 甘油体微黏度的影响

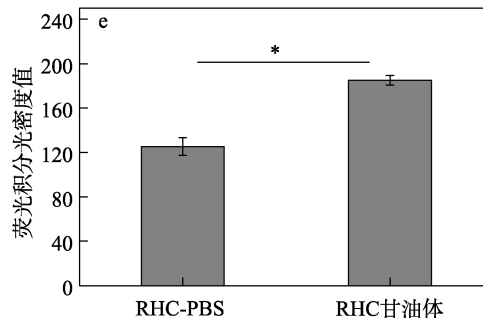
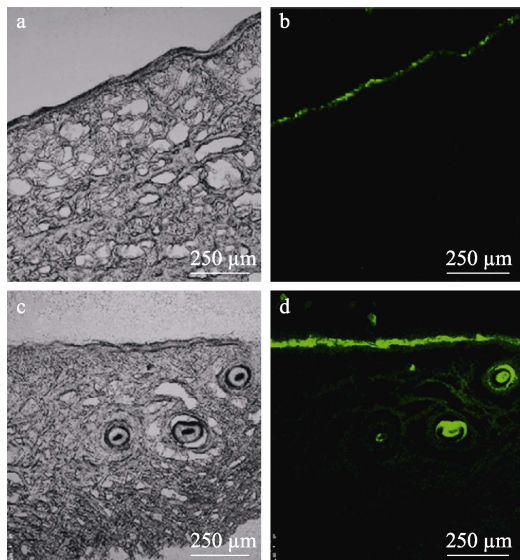
Fig. 8 Effect of Tween-80 mass concentration on microviscosity of RHC glycosomes

综上, 在磷脂质量浓度 150 g/L、RHC 质量浓度 2 g/L、甘油质量浓度 250 g/L、吐温 80 质量浓度 25 g/L 的条件下, 制备的 RHC 甘油体为黄色澄清透明液体, 稳定性最好, 粒径为 (92.34 ± 1.22) nm, PDI 为 0.233 ± 0.01 , 包封率为 $12.78\% \pm 0.13\%$ 。

2.6 RHC 甘油体的透皮性能分析

为避免皮肤中内源胶原蛋白的干扰, 以荧光示踪并对荧光定量以探究 RHC 甘油体的透皮性能。图 9 为 RHC 甘油体荧光示踪和荧光定量考察结果。

从图 9 可以看出, RHC-PBS (图 9a、b) 只在皮肤表面角质层有微弱荧光, 而 RHC 甘油体 (图 9c、d) 在皮肤角质层以及更深层的皮肤活力表皮和真皮层、毛囊处均有明显的荧光分布。



“*”代表数据间显著性差异 ($P < 0.05$)

图9 RHC-PBS、RHC 甘油体处理的猪皮横截面的 CLSM 图像明场图 (a、c) 和 FTIC 通道图 (b、d) 以及荧光强度定量统计图 (e)

Fig. 9 Bright field images (a, c) and FTIC channel images (b, d) of cross-section of pigskin treated with RHC solution and RHC glycosome, as well as quantitative statistics of fluorescence intensity (e)

经 ImageJ 软件对荧光强度定量分析^[2], RHC 甘油体在皮肤中渗透的荧光积分光密度值为 185.126 ± 4.22 , 明显高于 RHC-PBS 的荧光积分光密度值 125.217 ± 7.83 , 表明 RHC 甘油体具有更高的皮肤渗透量, 这与文献^[2,31]的研究结果一致。甘油体包封 RHC 不仅能够增强其在角质层的吸附, 还能显著促进在皮肤深处的扩散分布和在毛囊处的蓄积^[31], 从而增强 RHC 的经皮递送。

2.7 刺激性评价分析

以浓度 0.1 mol/L 的 NaOH 为阳性对照、质量分数 0.9% 的 NaCl 溶液为阴性对照, 采用鸡胚绒毛尿囊膜实验考察空白甘油体和 RHC 甘油体的刺激性, 图 10 为不同拍摄时间下的样品加入后鸡胚的照片。

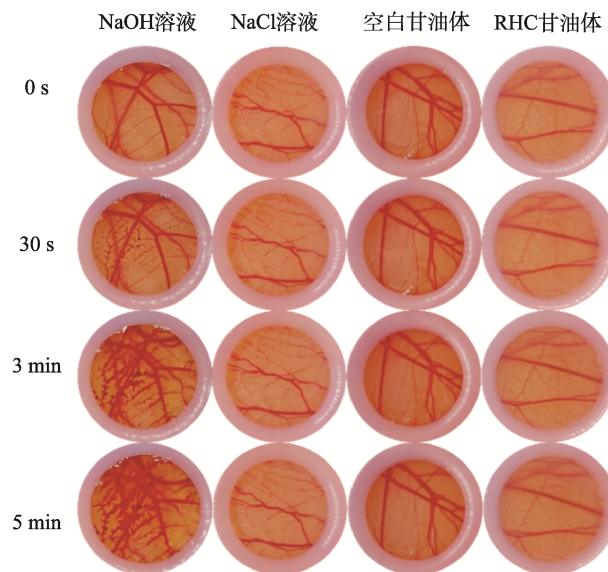


图10 甘油体的刺激性评价

Fig. 10 Stimulation evaluation of glycosomes

从图 10 可以看出,仅具有强刺激性的阳性对照 NaOH 溶液组依次在 27、50、140 s 表现了出血、血管溶解和凝血现象,而阴性对照组 NaCl 溶液组与空白甘油体组、RHC 甘油体组均未出现出血等现象,这与彭晏等^[27]的研究结果一致。结果表明,制备的甘油体安全、无刺激性。

3 结论

本文制备了包载重组人源Ⅲ型胶原蛋白的甘油体(RHC 甘油体),并对其稳定性和透皮性能进行了考察。

(1) 采用 Folch 法可以去除磷脂,避免检测甘油体中 RHC 含量的干扰,通过 UV-Vis 吸收光谱和 HPLC 谱图验证了对磷脂的去除,RHC 回收率为 100.44%±0.84%,能够应用于 RHC 包封率的准确检测。

(2) 在磷脂质量浓度 150 g/L、RHC 质量浓度 2 g/L、甘油质量浓度 250 g/L、吐温 80 质量浓度 25 g/L 的条件下,制备的 RHC 甘油体为黄色澄清透明液体,粒径为(92.34±1.22) nm, PDI 为 0.233±0.01,包封率为 12.78%±0.13%。

(3) RHC 甘油体具有更强的促渗能力,不仅能够增强 RHC 在皮肤的渗透,还能促进其在毛囊的蓄积,其自身安全无刺激。

参考文献:

- [1] SONG R N (宋若男), MA H W (马红伟), LUAN X Y (栾小艺), *et al.* Preparation of Rhc-Ⅲ cream and its pharmacodynamic evaluation of promoting wound healing[J]. *Pharmaceutical Biotechnology (药物生物技术)*, 2022, 29(2): 121-126.
- [2] LEE M S, BUI H T D, KIM S J, *et al.* Liposome-assisted penetration and antiaging effects of collagen in a 3D skin model[J]. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 2024, 23(1): 236-243.
- [3] LIU S (刘爽), LIU A Q (刘爱青), WANG J (王佳), *et al.* Effects of different collagen peptide and collagen tripeptide on photoaging in uvb-exposed human skin fibroblasts[J]. *The Food Industry (食品工业)*, 2023, 44(10): 125-130.
- [4] LI J (李佳), AN M Q (安苗青), LYU C H (吕晨豪), *et al.* Anti-aging effects and mechanisms of recombinant human-derived collagen on aging mouse induced by D-galactose[J]. *Science and Technology of Food Industry (食品工业科技)*, 2023, 44(10): 343-352.
- [5] HE X X (何杏杏), ZHAO Y (赵越), LU C G (鲁朝刚), *et al.* Study on the efficacy and evaluation of collagen, elastin and fibronectin in cosmetics[J]. *Fine and Specialty Chemicals (精细与专用化学品)*, 2023, 31(10): 39-43.
- [6] SHAN R M (单如梦). Preparation of Rhc-Ⅲ-lips gels and study on its effect on wound healing[D]. Jinan: Shandong University (山东大学), 2021.
- [7] DUAN X J (段晓杰), LIU S (刘珊), MA Y (马跃), *et al.* Evaluation of material permeability of type I collagen hydrogel[J]. *Chinese Journal of Medical Instrumentation (中国医疗器械杂志)*, 2018, 42(2): 140-143.
- [8] WANG X J (王小军). Study on the application of the optimum of human-like collagen series cosmetics[D]. Xi'an: Northwest University (西北大学), 2019.
- [9] LI M Y, LI M, LI X Y, *et al.* Preparation, characterization and *ex vivo* skin permeability evaluation of type I collagen-loaded liposomes[J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2023, 18: 1853-1871.
- [10] YUAN Y (袁雅), HUANG P (黄萍), YANG X L (杨秀丽). Review on research progress in liposomal transdermal drug delivery systems[J]. *Frontiers in Pharmaceutical Sciences (中国药师)*, 2014, 17(7): 1227-1231.
- [11] ZHANG Y Q (张雅琪). Preparation and properties of glycyrrhetic acid loaded glycethosomes[D]. Wuxi: Jiangnan University (江南大学), 2022.
- [12] MANCA M L, CASTANGIA I, CADDEO C, *et al.* Improvement of quercetin protective effect against oxidative stress skin damages by incorporation in nanovesicles[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2014, 123: 566-574.
- [13] WU Q Q (吴倩倩), YU L (禹柳), HOU L X (侯凌欣), *et al.* Determination of protein content in medical recombinant collagen repair dressing by Kjeldahl method[J]. *Chemical Analysis and Meterage (化学分析计量)*, 2024, 33(4): 31-36.
- [14] ZHAO M M (赵咪咪), YANG R T (杨瑞婷), WANG F R (王富荣), *et al.* The spectrophotometric method for quantifying collagen content on wool fabrics[J]. *China Dyeing & Finishing (印染)*, 2024, 50(7): 69-73.
- [15] WANG S Q (王世强), CHANG Y (常芸), MA X W (马晓雯), *et al.* Effects of endurance exercise of different intensity on cardiac collagen of rats and regulation of MMP-1/IMP-1[J]. *China Sport Science and Technology (中国体育科技)*, 2015, 51(5): 60-66.
- [16] WU X L (吴晓丽), LIN H S (林红赛), HUANG Y F (黄永富), *et al.* Determination of acid soluble type I collagen with size-exclusion high-performance liquid chromatography[J]. *Beijing Biomedical Engineering (北京生物医学工程)*, 2020, 39(2): 9.
- [17] ZHANG X Y (张晓芸), SUN X Y (孙星宇), YANG Z (杨政), *et al.* Determination of collagen content in recombinant type I human collagen repair gel by precolumn derivatization-high-performance liquid chromatography[J]. *Chemical Analysis and Meterage (化学分析计量)*, 2023, 32(12): 84-89.
- [18] ZOU D N (邹东娜), ZHANG D R (张典瑞), LIU X H (刘向红). HPLC determination of entrapment efficiency of matrine-loaded albumin nanoparticles[J]. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis (药物分析杂志)*, 2008, 28(1): 4.
- [19] WANG J L (汪俊丽). Fluorescent immunoassays for SEB and estradiol based on upconversion nanoparticles[D]. Changsha: Hunan Normal University (湖南师范大学), 2013.
- [20] FOLCH J, LEES M, STANLEY G H S. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1957, 226(1): 497-509.
- [21] FIROZNEZHAD M, CASTANGIA I, TUBEROSO C I G, *et al.* Formulation and *in vitro* efficacy assessment of teucrium marum extract loading hyalurosomes enriched with tween 80 and glycerol[J]. *Nanomaterials*, 2022, 12(7): 1096-1096.
- [22] CEQUIER-SÁNCHEZ E, RODRÍGUEZ C, RAVELO A G, *et al.* Dichloromethane as a solvent for lipid extraction and assessment of lipid classes and fatty acids from samples of different natures[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56(12): 4297-4303.
- [23] XI X (席鑫), DING X Y (丁新月), FA J J (法菁菁), *et al.* Determination of ginsenoside Rh2 in plasma of mice by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Academic Journal of Naval Medical University (海军军医大学学报)*, 2025, 46(2): 268-272.
- [24] LIANG R (梁蓉), JIA L P (贾利萍), YANG C (杨成). Preparation and properties of binary ceramide modified ethosomes for encapsulation of retinol palmitate and carnosine[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2025, 42(1): 159-165, 232.
- [25] PU M L (蒲美玲), LIANG R (梁蓉), ZHAO B T (赵炳天), *et al.* Preparation of madecassoside derivative ceramide ethosomes and its skin penetration properties[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2025, 42(12): 2734-2741.
- [26] PENG Y (彭晏), DING W F (丁文锋), ZHAO W H (赵文豪), *et al.* Preparation of palmitoyl tripeptide-8 liposome and its application in

- cosmetics[J]. *Flavour Fragrance Cosmetics* (香料香精化妆品), 2023(4): 66-71.
- [27] GUPTA S, CHAKRABORTY A, SEN P. Elucidation of intriguing methanol-dichloromethane binary solvent mixture: Synergistic effect, analytical modeling, NMR and photo-induced electron transfer studies[J]. *Journal of Molecular Liquids*, 2016, 223: 274-282.
- [28] HAO S L (郝少莉), QIU N X (仇农学). Applications of precipitation separation technologies in handling protein[J]. *Cereal & Food Industry* (粮食与食品工业), 2007, 14(1): 20-22.
- [29] NICKERSON J L, BAGHALABADI V, DANG Z H, *et al.* Organic solvent-based protein precipitation for robust proteome purification ahead of mass spectrometry[J]. *Journal of Visualized Experiments*, 2022, 180: e63503.
- [30] CHANG Z G (常振刚), LIU Y J (刘彦君), PAN L (潘丽), *et al.* Optimization of preparation process of liposomes co-encapsulating phytosterol oleate and astaxanthin[J]. *China Oils and Fats* (中国油脂), 2023, 48(6): 108-113, 144.
- [31] RAMKAR S, SAH A K, BHUWANE N, *et al.* Nano-lipidic carriers as a tool for drug targeting to the pilosebaceous units[J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2020, 26(27): 3251-3268.

(上接第 997 页)

- [13] NGUYEN D K, BACH Q V, KIM B, *et al.* Synthesis of Cr-doped Al_2O_3 by Pechini sol-gel method and its application for reversible thermochromic sensors[J]. *Materials Chemistry and Physics*, 2019, 223: 708-714.
- [14] YU C F (禹崇菲). Preparation, characterization and photocatalytic properties of a novel nano- BiVO_4 [D]. *Xinxiang: Henan Normal University* (河南师范大学), 2013.
- [15] GAO S M (高善民), QIAO Q A (乔青安), ZHAO P P (赵培培), *et al.* Synthesis of different morphologies and structures of nano-sized BiVO_4 by precipitation method[J]. *Chinese Journal of Inorganic Chemistry* (无机化学学报), 2007, 23(7): 1153-1158.
- [16] LIU H H (刘欢欢), YUAN L (袁龙), LIU J H (刘景海), *et al.* Preparation and thermochromic property of Fe^{3+} -doped $\text{Sm}_3\text{Ga}_5\text{O}_{12}$ [J]. *Chemical Journal of Chinese Universities* (高等学校化学学报), 2019, 40(4): 652-658.
- [17] WANG J L (王捷琳), LIAO R (廖蕊), LI Y L (李园利), *et al.* Structural, morphological and spectral properties of BiVO_4 nanocrystals fabricated by a chemical protocol[J]. *Journal of Sichuan University: Natural Science Edition* (四川大学学报: 自然科学版), 2020, 57(2): 341-347.
- [18] SUN Y F, WU C Z, LONG R, *et al.* Synthetic loosely packed monoclinic BiVO_4 nanoellipsoids with novel multiresponses to visible light, trace gas and temperature[J]. *Chemical Communications*, 2009, 30: 4542-4544.

(上接第 1007 页)

- [25] GUO Y N (郭雅妮), LI J C (李金成), HUI F (惠璠), *et al.* Preparation of humic acid-acrylic acid absorbent resin from weathered coal by ultrasonic-assisted method[J]. *Journal of Functional Materials* (功能材料), 2020, 51(4): 4164-4169.
- [26] ZHANG X P (张笑培), CHANG X (常晓), YANG S J (杨慎骄), *et al.* Effects of water and straw mulching on soil respiration and carbon balance in summer maize farmland[J]. *Journal of Irrigation and Drainage*, 2024, 43(1): 1-8.
- [27] LIU Y (刘颖), GENG D D (耿丹丹), HAN Y S (韩永胜), *et al.* Environment-friendly superabsorbent: Development, property and application[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin* (中国农学通报), 2022, 38(7): 86-90.
- [28] ZHAI C Y (翟车宇), LUO J M (骆静梅), LIU C J (刘昌杰), *et al.* Effects of long-term manure fertilizer on saline-sodic properties and stoichiometric ratio of saline-sodic soil in songnen plain[J]. *Journal of Agricultural Science and Technology* (中国农业科技导报), 2024, 26(2): 153-161.
- [29] XU C Z (徐长忠), YU J H (於金浩), LI Y L (李义连). Research progress of pretreatment and comprehensive utilization of phosphogypsum[J]. *Safety and Environmental Engineering* (安全与环境工程), 2024, 31(1): 260-270.
- [30] ZHANG Y F, TIAN X Y, ZHANG Q Y, *et al.* Hydrochar-embedded carboxymethyl cellulose-g-poly(acrylic acid) hydrogel as stable soil water retention and nutrient release agent for plant growth[J]. *Journal of Bioresources and Bioproducts*. 2022, 7(2): 116-127.

(上接第 1066 页)

- [14] SHINODA K, MINEGISHI Y, ARAI H. Correlation between melting points of alkanolic acids and Krafft points of their sodium salts[J]. *The Journal of Physical Chemistry*, 1976, 80(18): 1987-1988.
- [15] DUAN S F, JIANG Y J, GENG T, *et al.* Wetting, foaming, and emulsification properties of novel methyltriphenylphosphonium carboxylate ionic liquid surfactants[J]. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 2020, 41(1): 47-53.
- [16] BAI Y, PU C S, HUANG F F, *et al.* Effect of the hydroxymethyl groups of quaternary ammonium salt cationic surfactants on surface activity and corrosion[J]. *Desalination and Water Treatment*, 2020, 194: 143-151.
- [17] SIMMONS R N. Comparison of transport effects of perfluorinated and hydrocarbon surfactants on environmental co-contaminants[M]. East Lansing: Michigan State University, 2011.
- [18] JIAO J J, MA C, ZHANG L L, *et al.* Synthesis and aggregation behavior of hexameric quaternary ammonium salt surfactant $\text{Tz-6C}_{12}\text{QC}$ [J]. *Polymers*, 2023, 15(22): 4396.
- [19] DU Y (杜瑞), LI J (李杰), BAI L (白璐), *et al.* Synthesis and physicochemical properties of a branched quaternary ammonium salt trimeric surfactant[J]. *Science & Technology in Chemical Industry* (化工科技), 2023(4): 1-6.
- [20] ZHOU L M, JIANG X H, LI Y T, *et al.* Synthesis and properties of a novel class of gemini pyridinium surfactants[J]. *Langmuir*, 2007, 23(23): 11404-11408.
- [21] BENHUR A M, DIAZ J, AMIN S. Impact of polyelectrolyte surfactant interactions on the rheology and wet lubrication performance of conditioning shampoo[J]. *International Journal of Cosmetic Science*, 2021, 43(2): 246-253.