壳聚糖修饰绿原酸脂质体的制备及其体外透皮性能考察

万子腾，张　跃，姜建鑫，李海刚*
（临沂大学医学院，山东临沂 276000）

摘要：采用 Box-Behnken 设计结合响应面法优化了绿原酸（**1**）脂质体的处方，再采用壳聚糖对 **1** 脂质体进行表面修饰。透射电镜观测结果显示，未表面修饰或表面修饰脂质体均为球形，表面修饰后的制品具有明显的核 - 壳结构。所得脂质体和表面修饰脂质体的粒径分别为（185.0±10.8）和（265.0±11.9）nm，ζ 电位为（－18.3±2.1）和（45.6±3.5）mV。体外释放试验表明，**1** 脂质体的体外释药行为用 Higuchi 模型拟合效果较好，而壳聚糖修饰脂质体则采用 Korsmeyer-Peppas 模型拟合的效果较好。采用改良的 Franz 扩散池法考察制品对小鼠皮肤的体外透皮性能。结果显示，**1** 溶液、**1** 脂质体和壳聚糖修饰 **1** 脂质体的稳态渗透通量分别为 1.77、0.98、0.73 μg·cm^{-2}·h^{-1}，36 h 时的皮肤滞留量分别为（113.4±7.4）、（399.6±5.5）、（519.6±13.1）μg/cm^2。可见，与 **1** 溶液和 **1** 脂质体相比，壳聚糖修饰 **1** 脂质体的皮肤渗透量减小，但皮肤滞留量增加，作为 **1** 皮肤给药载体具有较大潜力。

关键词：绿原酸；脂质体；壳聚糖；表面修饰；体外释放；透皮特性
中图分类号：R944.9　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2023)05-0760-06
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2023.05.016

Preparation of Chitosan-modified Chlorogenic Acid Liposomes and Investigation on Their Transdermal Properties *in vitro*

WAN Ziteng, ZHANG Yue, JIANG Jianxin, LI Haigang*
(*School of Medicine, Linyi University, Linyi 276000*)

ABSTRACT: The optimal formulation of chlorogenic acid (**1**) liposomes was developed using a combination of Box-Behnken design and response surface methodology. Subsequently, the liposomes were surface modified with chitosan. The results of transmission electron microscopy revealed that liposomes with or without surface modification were spherical, while the surface modification liposomes displayed a distinct core-shell structure. The average particle sizes of above two liposomes were (185.0±10.8) and (265.0±11.9) nm, respectively, while the ζ potentials were (－18.3±2.1) and (45.6±3.5) mV. The results of *in vitro* release test indicated that the release behavior of **1** from the unmodified liposomes fit the Higuchi model well, while the chitosan-modified liposomes exhibited a better fit to the Korsmeyer-Peppas model. The improved Franz diffusion cell method was used to investigate the *in vitro* transdermal performance of the product on mouse skin. The steady-state permeation fluxes of **1** solution, **1** liposomes and chitosan-modified **1** liposomes were 1.77, 0.98 and 0.73 μg·cm^{-2}·h^{-1}, respectively, with skin retention at 36 h of (113.4±7.4), (399.6±5.5), and (519.6±13.1) μg/cm^2. These results suggested that chitosan-modified **1** liposomes had lower skin penetration but higher skin retention than those of **1** solution and **1** liposomes, making them a promising candidate for transdermal drug delivery.

Key Words: chlorogenic acid; liposome; chitosan; surface modification; *in vitro* release; transdermal property

收稿日期：2022-09-18
作者简介：万子腾(2002—)，男，2019 级本科生。
通信作者：李海刚(1983—)，男，博士，从事药物传递系统的研究。
E-mail：lihg2014@126.com

绿原酸（chlorogenic acid，**1**）由咖啡酸和奎尼酸缩合而成，属于多酚类化合物，具有清除自由基、抗菌、抗氧化、抗病毒等药理作用[1]。**1** 口服后被

机体迅速代谢为咖啡酸和奎宁酸，生物利用度低[2]；注射给药则易引起过敏反应[3]。经皮给药能提高**1**生物利用度，且不良反应小，有利于发挥局部或全身作用[4]。然而**1**经皮渗透性较差，因此设计合适的载体提高其经皮渗透性具有重要意义。

脂质体是一种由磷脂双分子层组成的囊泡，易与皮肤角质层融合，具有增强药物皮肤渗透性的潜力[5]。壳聚糖是一种天然阳离子多糖，能够通过打开角质层细胞间的紧密连接来增强上皮细胞的通透性[6]，同时又因荷正电荷，可与皮肤表面的负电荷相互作用，从而促进药物向皮肤深层扩散[7]。基于此，考虑利用壳聚糖与脂质体在增强药物皮肤渗透性方面的优势，开发壳聚糖修饰的脂质体以提高**1**的皮肤渗透性。

本研究通过Box-Behnken设计优化了**1**脂质体的处方和工艺，通过带正电荷的壳聚糖与表面荷负电荷的**1**脂质体相互作用，对**1**脂质体进行修饰，考察壳聚糖修饰**1**脂质体的体外释放机制及透皮性能，为**1**的皮肤给药载体研究提供参考。

1 仪器与试药

1260型高效液相色谱仪（美国Agilent公司）；ZTJZ-500S型高速乳匀机（上海众托实业有限公司）；JEM-2100型透射电镜（日本电子株式会社）；KBS-250型超声波细胞粉碎机（昆山市超声仪器有限公司）；1.5 mL超滤离心管（截留分子量10 000，美国Millipore公司）。

1（上海毕得医药科技股份有限公司，含量>95%，批号ASA721）；**1**对照品（上海源叶生物科技有限公司，HPLC纯度>98%，批号Y24J7K16726）；二乙二醇单乙基醚［嘉法狮（上海）贸易有限公司，商品名Transcutol® HP］；聚乙二醇十二羟基硬脂酸酯（德国巴斯夫公司，Kolliphor® HS15）；大豆磷脂（沈阳天峰生物制药有限公司，磷脂酰胆碱含量>95%）；壳聚糖（上海易恩化学技术有限公司，脱乙酰度>95%）；甲醇、乙腈均为色谱纯，其他试剂为分析纯。

BALB/c（小鼠，雄性，18～20 g，由济南朋悦实验动物繁育有限公司提供，动物合格证编号370726230100474012）。本研究中对实验动物的护理和程序得到了临沂大学伦理委员会的批准（20211126）。

2 方法与结果

2.1 1脂质体的制备流程

取处方量的大豆磷脂、Kolliphor® HS15、胆固醇硫酸钠（SCS）及**1** 50 mg，溶于2 mL的Transcutol® HP中，搅拌使形成澄明溶液，作为有机相；将有机相缓慢滴至纯水20 mL中，滴入过程维持高速搅拌，滴加完毕后置细胞粉碎机中超声处理1 min，经0.22 μm滤膜过滤，即得**1**脂质体。

2.2 响应面法优化壳聚糖修饰1脂质体的处方

2.2.1 含量测定

采用HPLC法测定**1**含量。色谱条件如下：色谱柱Kromasil C_{18}柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相A为乙腈，B为0.4%磷酸溶液，线性梯度洗脱（0—15 min，A 10%—20%；15—40 min，A 20%—30%）；检测波长350 nm；柱温室温；流速1 mL/min；进样量20 μL。**1**质量浓度在0.01～1.01 mg/mL与峰面积呈良好的线性关系。该方法专属性良好，回收率为100.03%，RSD为0.89%，精密度为0.62%。

2.2.2 包封率测定

取**1**脂质体0.5 mL，加入无水乙醇1.5 mL，超声0.5 min，经0.45 μm滤膜过滤，取续滤液进行HPLC测定，得药物总含量。另取脂质体样品0.5 mL，加入pH 7.4磷酸盐缓冲液1.5 mL，摇匀，取适量置0.5 mL离心超滤管中，离心（410×*g*）5 min。取续滤液进行HPLC测定，计算游离药物含量及包封率。

2.2.3 Box-Behnken设计结合响应面法优化

选择磷脂（因素*A*）、Kolliphor® HS15（因素*B*）、SCS（因素*C*）的体积分数为考察因素，以包封率实测值（*Y*）为指标，采用三因素三水平Box-Behnken设计，照“**2.1**”项下方法制备**1**脂质体。各因素水平如表1所示，试验方案及结果如表2所示。

2.2.4 模型拟合及分析

利用Design-Expert（version 12.0）软件对表2中的试验数据进行二次多项式逐步回归拟合，得到的数学模型为：$Y=15.48A+22.93B+30.35C-1.10AB-0.20AC+12.00BC-2.44A^2-23.00B^2-63.20C^2+63.36$；

表 1　Box-Behnken 设计的因素及水平

Tab.1　Factors and Levels for Box-Behnken Design

水平	因素		
	A/%	*B*/%	*C*/%
－1	1.75	1.0	0.15
0	2.75	3.0	0.35
1	3.75	5.0	0.55

表 2　Box-Behnken 设计的方案及试验结果

Tab.2　Scheme and Experimental Results of Box-Behnken Design

试验号	*A*	*B*	*C*	*Y*/%
1	－1	－1	0	91.1
2	1	－1	0	94.4
3	－1	1	0	91.8
4	1	1	0	94.0
5	－1	0	－1	91.3
6	1	0	－1	94.5
7	－1	0	1	92.1
8	1	0	1	95.2
9	0	－1	－1	94.1
10	0	1	－1	93.1
11	0	－1	1	94.7
12	0	1	1	95.2
13	0	0	0	97.5
14	0	0	0	96.8
15	0	0	0	95.8
16	0	0	0	96.1
17	0	0	0	97.3

模型决定系数 R^2=0.960 9，说明该模型能解释 96.09%响应值变化，即表明该回归模型可良好地对响应值的变化进行拟合，拟合度较好。

绘制各因素对包封率的响应面图及等高线图，结果如图 1 所示。

由图 1 可见，包封率随 3 种因素的不断增大均呈现先增大后减小的趋势。磷脂是脂质体的主要囊材，随磷脂用量的增加，包封率不断提高，但过多的磷脂致使制备过程中磷脂分散困难，包封率反而下降。Kolliphor® HS15 具有两亲性，在处方中主要协助磷脂分散于水相中形成脂质体，但过多的 Kolliphor® HS15 有可能破坏脂质体结构，致使包封率下降。SCS 穿插在磷脂双分子膜中间起缓冲、稳定作用，帮助脂质体包封药物，但过多的 SCS 占据了较多的磷脂双分子层空间，反而降低了脂质体对药物的包封率。

通过软件进行优化分析，所得优化处方为磷脂 3.62%、Kolliphor® HS15 2.88%和 SCS 0.40%，预测包封率为 96.22%。按上述优化处方制备 3 批样品，测得平均包封率为 (95.78±1.29) %。

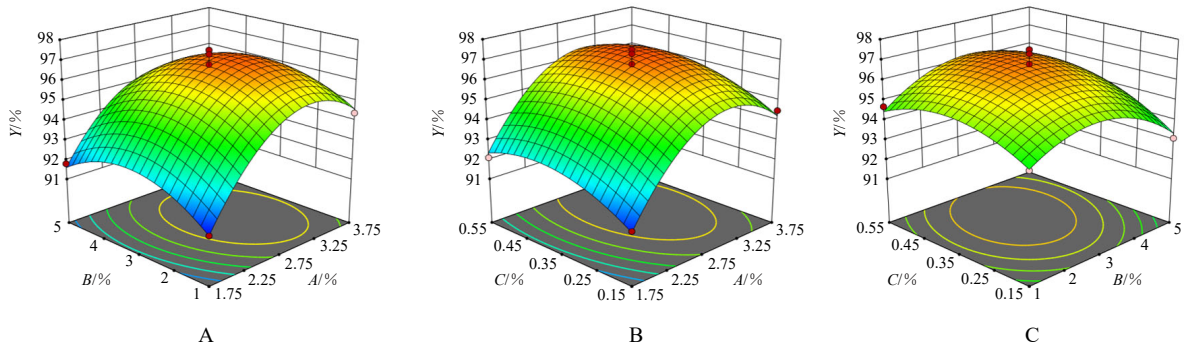
2.3　壳聚糖修饰 1 脂质体的制备

将适量壳聚糖溶于 0.5% 的乙酸溶液中制备 0.5%壳聚糖溶液，在持续搅拌条件下将 **1** 脂质体缓慢注入壳聚糖溶液中，滴加完毕后继续搅拌 1 h，得壳聚糖修饰 **1** 脂质体。

2.4　理化性质考察

2.4.1　粒度分布及 ζ 电位的测定

取样品混悬液稀释至适当的浓度，用激光粒度仪测定粒径及 ζ 电位，平行测定 3 次。结果表明，**1** 脂质体和壳聚糖修饰 **1** 脂质体的平均粒



A—因素 *A* 和 *B* 对 *Y* 的影响；B—因素 *B* 和 *C* 对 *Y* 的影响；C—因素 *A* 和 C 对 *Y* 的影响。

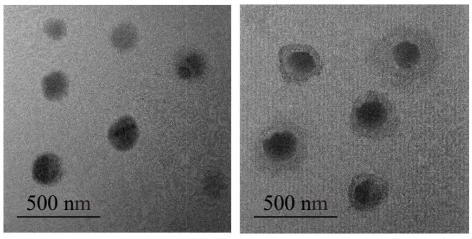
图 1　三因素对包封率影响的响应面图

Fig.1　Response Surface Plots of the Effects of Three Factors on Encapsulation Efficiency

径为（185.0±10.8）和（265.0±11.9）nm，ζ电位为（－18.3±2.1）和（45.6±3.5）mV。**1** 脂质体经壳聚糖修饰后，脂质体粒径及ζ电位均有所增加，其中ζ电位由 －18.3 mV 增加到 45.6 mV。说明壳聚糖在脂质体表面的吸附不仅增加了脂质体的粒径，而且改变了脂质体表面电荷。

2.4.2 形态学考察

取样品混悬液适量，滴加于铜网上，用体积分数为1%的磷钨酸溶液负染 2 min，自然干燥后在透射电镜下观察其形态。**1** 脂质体及壳聚糖修饰 **1** 脂质体的电镜照片如图 2 所示。结果显示，**1** 脂质体轮廓清晰，呈近圆球状，粒度分布较均匀；壳聚糖修饰 **1** 脂质体具有明显的核壳结构，说明带正电荷的壳聚糖吸附在带负电荷的脂质体表面。



A B

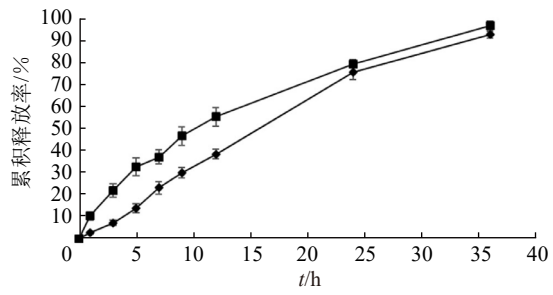
图 2 1 脂质体（A）及壳聚糖修饰 1 脂质体（B）的 TEM 照片（×10 000）

Fig.2 TEM Images (×10 000) of **1** Liposomes (A) and Chitosan-modified **1** Liposomes (B)

2.4.3 体外释放行为

取样品混悬液 2 mL，装入经蒸馏水浸泡处理过的透析袋中（截留分子量 30 000），置 pH 5.0 的乙酸盐缓冲液（含 5%乙醇）200 mL 中，于 37 ℃、70 r/min 搅拌条件下试验。分别于 1、3、5、7、9、12、24、36 h 时取样 1.0 mL（同时补加同温等量的释放介质），经 0.45 μm 滤膜过滤，取续滤液经 HPLC 法测定 **1** 含量，计算 **1** 累积释放率。结果如图 3 所示。

由释药曲线可见，**1** 脂质体经壳聚糖修饰后，释放速度减慢。将累积释放率数据分别采用零级、一级、Korsmeyer-Peppas 及 Higuchi 动力学模型进行拟合，以拟合方程的 R^2 为标准来判断拟合效果



■—**1** 脂质体；◆—壳聚糖修饰 **1** 脂质体。

图 3 1 脂质体及壳聚糖修饰 1 脂质体的体外释药曲线（n=3）

Fig.3 *In vitro* Release Curves of **1** Liposomes and Chitosan-modified **1** Liposomes (n=3)

的优劣。结果表明，**1** 脂质体的体外释药行为采用 Higuchi 模型拟合的效果较好（R^2=0.994 0），可见药物自脂质体中的释放机制为骨架扩散；而壳聚糖修饰 **1** 脂质体的体外释药动力学采用 Korsmeyer-Peppas 模型拟合的效果较好（R^2=0.989 5），根据释放指数（n=1.059 7）确定其释药机制为溶蚀释放机制，脂质体表面壳聚糖层的缓慢溶蚀是药物释放的限速步骤。

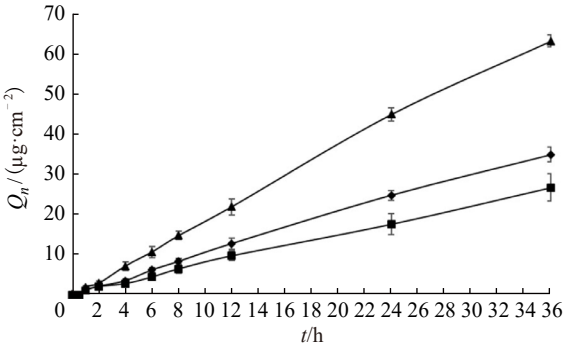
2.4.4 体外透皮试验

采用改良的 Franz 扩散池进行体外透皮试验[8]。小鼠经剃毛、处死后取腹部皮肤，固定在供给池和接收池间，角质层一侧朝向供给池。供给池分别给予 **1** 脂质体、壳聚糖修饰 **1** 脂质体及 **1** 的磷酸盐溶液（pH 7.4）5 mL（每个样品均平行试验 3 次），接收池注入 32 ℃的 pH 7.4 磷酸盐缓冲液 15 mL。分别于 0.5、1、2、4、6、8、12、36 h 时取样 0.5 mL（同时补入同温等量的接收液）。取出的接收液过滤后经 HPLC 法测定 **1** 含量，计算累积渗透量（Q_n）。

$$Q_n=\frac{Vc_n+\sum_{i=1}^{n-1}V_i c_i}{A}$$

式中：Q_n 为 t 时刻单位面积累积透过量；c_n 为 t 时刻接收液中 **1** 的质量浓度；c_i 为第 i 次取样时接收液中 **1** 的质量浓度；V_i 为取样体积；V 为接收池体积，A 为有效扩散面积（1.77 cm^2）。以 Q_n 为纵坐标、t 为横坐标绘制累积渗透曲线，由曲线线性部分的斜

率计算得稳态渗透通量（J_{ss}）。结果如图 4 所示。试验终止后，取下鼠皮，用蒸馏水洗净皮肤，剪碎后加入 50%乙醇溶液浸泡 6 h，过滤，用 HPLC 法测定滤液中 **1** 的含量，计算 **1** 皮肤滞留量。



▲—**1** 溶液；◆—**1** 脂质体；■—壳聚糖修饰 **1** 脂质体。

图 4　体外皮肤渗透曲线（*n*=3）

Fig.4　*In vitro* Skin Penetration Curves（*n*=3）

由图 4 可见，**1** 脂质体和壳聚糖修饰 **1** 脂质体的皮肤渗透量低于 **1** 溶液。**1** 溶液、**1** 脂质体和壳聚糖修饰 **1** 脂质体的 J_{ss} 分别为 1.77、0.98、0.73 μg·cm^{-2}·h^{-1}，36 h 时的皮肤滞留量分别为（113.4±7.4）、（399.6±5.5）、（519.6±13.1）μg/cm^2。可见，与 **1** 溶液相比，**1** 脂质体和壳聚糖修饰 **1** 脂质体的皮肤渗透量减小，但皮肤滞留量增加。

3　讨论

壳聚糖修饰的脂质体已有文献[9—10]报道，大多用于增加脂质体的体内外稳定性，用作透皮递送载体的研究较少。**1** 水溶性差，本研究将其包裹于脂质体双分子膜中以改善其皮肤渗透性。体外透皮试验表明，**1** 脂质体的皮肤滞留量增加，而稳态渗透通量减小；经壳聚糖修饰后，皮肤滞留量进一步增加，稳态渗透通量也进一步减小。推测原因是经壳聚糖修饰后，脂质体表面带正电荷，与皮肤表面的负电荷相互吸引，增加了脂质体与皮肤亲和力，有可能通过在毛囊、汗腺、皮脂腺等皮肤附属器处聚集的方式形成药物储库，从而增加药物局部皮肤滞留量。皮肤滞留量的增加有利于皮肤局部疾病的治疗，同时随着 **1** 从皮肤内部的药物储库中不断释放，可发挥局部长效作用。

局部皮肤疾病的治疗，一般不需要药物经皮吸收进入血液循环，药物有效渗透进入皮肤内部并保持局部较高浓度对于局部药效的发挥更加有利。文献[11]报道纳米载体能增加药物的细胞摄取，并且目前已有多种纳米载体用于促进药物经皮递送[12—13]，然而纳米载体促进药物经皮递送的机制仍然不清楚。人体皮肤角质层是由脂质、蛋白质和非纤维蛋白等相互镶嵌组成的，其致密结构是外来物质的有效屏障，药物透过角质层进入皮肤主要有 3 种途径，即皮肤附属器（毛囊、汗腺、皮脂腺）、细胞间隙及细胞途径。WATKINSON 等[14]认为纳米粒不能以完整结构渗透进入皮肤，而是通过在皮肤附属器处聚集的方式促进药物渗透进入皮肤深层，因此皮肤附属器是纳米颗粒进入皮肤深层的重要途径。然而，由于皮肤附属器占人体皮肤表面积的比例低于 1%，因此也有学者认为这并不是药物渗透进入皮肤的主要途径[15]。壳聚糖修饰 **1** 脂质体的皮肤渗透机制将是下一步研究的课题。

致谢：临沂大学 2022 年大学生创新创业项目（X202210452416）给予资助。

参考文献：

[1] NAVEED M, HEJAZI V, ABBAS M, *et al*. Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, **97**: 67-74.

[2] 赵安权, 王倩倩, 李　佳, 等. 绿原酸磷脂复合物固体分散体的体外溶出和药动学研究[J]. 中国测试, 2015, **41**(1): 54-57.

[3] LU Y, LI S, XU H, *et al*. Effect of covalent interaction with chlorogenic acid on the allergenic capacity of ovalbumin [J]. *J Agric Food Chem*, 2018, **66**(37): 9794-9800.

[4] 朱雯宇, 张　倩, 朱玉欣, 等. 不同浓度促透剂对绿原酸体外透皮吸收的影响[J]. 中兽医医药杂志, 2017, **36**(1): 5-8.

[5] 陈观凤, 杨馥桢, 郑中杰, 等. 黄藤素脂质体的制备及其体外透皮研究[J]. 中药新药与临床药理, 2022, **33**(1): 115-119.

[6] NAWAZ A, WONG T W. Quantitative characterization of chitosan in the skin by Fourier-transform infrared spectroscopic imaging and ninhydrin assay: application in transdermal sciences [J]. *J Microsc*, 2016, **263**(1): 34-42.

[7] TAKEUCHI I, TAKESHITA T, SUZUKI T, *et al*. Iontophoretic transdermal delivery using chitosan-coated PLGA nanoparticles for positively charged drugs [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2017, **160**: 520-526.

[8] 周 刚, 付晓婷, 潘静茹, 等. 他克莫司软膏透皮一致性的体外Franz扩散池测定比较研究[J]. 药物分析杂志, 2020, **40**(12): 2126-2133.

[9] 赵振刚, 刘 爽, 游丽君. 壳聚糖修饰甜菜红素脂质体的制备与抗肿瘤活性[J]. 华南理工大学学报: 自然科学版, 2022, **50**(1): 16-22.

[10] 倪 斌, 高 畅, 方春云, 等. *N*-三甲基壳聚糖包覆茵陈总黄酮脂质体的制备及对小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 中国医药工业杂志, 2022, **53**(6): 857-861.

[11] HUANG C S, XU Q C, DAI C, *et al*. Nanomaterial-facilitated cyclin-dependent kinase 7 inhibition suppresses gallbladder cancer progression via targeting transcriptional addiction [J]. *ACS Nano*, 2021, **15**(9): 14744-14755.

[12] 吴昭全, 蒋远流, 罗怀青, 等. 羟基积雪草酸固体脂质纳米凝胶的制备及体内外透皮特性研究[J]. 中国药师, 2022, **25**(7): 1150-1156.

[13] 邢桂英, 邵林军. 纳米载体在中药制剂经皮给药应用中的研究进展[J]. 华西药学杂志, 2020, **35**(1): 101-105.

[14] WATKINSON A C, BUNGE A L, HADGRAFT J, *et al*. Nanoparticles do not penetrate human skin--a theoretical perspective [J]. *Pharm Res*, 2013, **30**(8): 1943-1946.

[15] HADGRAFT J. Modulation of the barrier function of the skin [J]. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*, 2001, **14**(Suppl 1): 72-81.

