拉曼光谱成像技术在药物经皮渗透行为考察中的应用

沈心怡，胡韵池，熊闫然，康　燕*，杜一平
（华东理工大学化学与分子工程学院，上海 200237）

摘要：该研究将拉曼光谱成像技术应用于药物分子透皮渗透分析，通过面扫描技术采集离体皮肤剖面的拉曼光谱，采用多元线性回归建立目标物浓度与信号强度的半定量分析模型。再将浓度贡献系数以热图的形式呈现，得到了目标物在皮肤中的浓度分布信息，实现了目标物浓度分布的可视化分析。以水杨酸为目标物，采用拉曼光谱成像技术研究其在猪皮肤中的渗透行为，2 次平行试验中角质层中的目标物浓度贡献系数为 0.231％和 0.275％，活性表皮层中为 3.1×10^{-4} 和 2.4×10^{-4}。将拉曼光谱成像结果和 HPLC 结果进行对比分析，可见 2 种方法得到的目标物浓度变化趋势一致，表明采用拉曼光谱成像技术得到的浓度贡献系数可用于半定量分析，为研究目标物经皮吸收特性、处方优化等提供了新的技术手段。此外，还采用该法考察了不同相对分子质量透明质酸在猪皮中的渗透分布情况，同样实现了皮肤中大分子分布的可视化分析。

关键词：拉曼光谱；多元线性回归；经皮渗透；可视化分析
中图分类号：O657.37；R917　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2023)05-0683-08
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2023.05.006

Applications of Raman Spectroscopy and Imaging Technology in Investigations on Percutaneous Penetration Behaviors of Drugs

SHEN Xinyi, HU Yunchi, XIONG Yinran, KANG Yan*, DU Yiping
(*School of Chemistry & Molecular Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237*)

ABSTRACT: Raman spectroscopy and imaging technology were applied to investigate percutaneous penetration profiles of drugs in this paper. Raman spectra of the *ex vivo* skin samples were collected by mapping technique. Then, a semiquantitative analysis model of concentration and signal intensity of an analyte had been established using multiple linear regression. On this basis, the contribution coefficients of concentration were presented in the form of heat maps to achieve the visual analysis of permeability distribution of the analyte in the skin. Percutaneous permeation analysis of salicylic acid in pig skins was conducted using Raman spectroscopy and imaging technology. The concentration contribution coefficients of salicylic acid were 0.231％ and 0.275％ in the stratum corneum, and 3.1×10^{-4} and 2.4×10^{-4} in the active epidermal layer in the parallel experiments. Compared with the results determined by HPLC method, it was found that the change trend of drug concentration by the two methods was consistent, indicating that the concentration contribution coefficient obtained by Raman spectroscopy could be used for semiquantitative analysis, which provided a new technical means for studying the percutaneous absorption characteristics of the analyte and formulation optimization. In addition, the permeation distribution of hyaluronic acid with different relative molecular weights in pig skin was also investigated by this method, and the visual analysis of distribution of macromolecular drugs in skin was also realized.

Key Words: Raman spectroscopy; multiple linear regression; percutaneous penetration; visual analysis

研究药物在皮肤中的渗透浓度分布，可以为产品处方优化、功效评价等提供重要的数据支撑。皮肤由外到里分为表皮层、真皮层和皮下组织。药物活性成分需穿透角质层才能起到相应的作用。因此，

收稿日期：2022-07-11
作者简介：沈心怡(1998—)，女，硕士研究生，专业方向：光谱分析。
通信作者：康　燕(1983—)，女，博士，高级工程师，从事拉曼光谱成像技术的研究。
E-mail：kangyanhd@ecust.edu.cn

检测表皮及真皮内的目标物含量是优化处方的第一步。目前常用黏性胶带剥离法移除角质层，再从余下皮肤中提取目标物来评估皮下药物浓度[1—2]。然而，移除角质层的方法费时、费力，目标物浓度评估易受提取方法、人为操作因素的影响。并且，该法只能得到皮肤中目标物浓度值，不能获得药物在皮肤中的实际分布情况。因此，快速、可视化地研究药物活性成分在皮肤中的渗透浓度分布能更直观、有效地指导经皮给药系统的处方优化，加快研究进程。

拉曼散射光谱是一种振动光谱技术，能反映化合物的结构，所得图谱携带丰富的指纹信息，具有无损、原位分析等特点[3—5]。光谱信号强度与待分析物浓度之间的关系遵循朗伯 - 比尔定律，信号强度与浓度成正比。此外，拉曼光谱是采用可见光区的激光来研究中红外区的分子振动信息，具有微米级的空间分辨率和良好的穿透能力，能高空间分辨率地研究待分析物在皮肤内的空间分布。

目前已有一些采用拉曼光谱技术研究皮肤中药物分子渗透情况的报道[6—9]，大部分采用单轴 z 剖面进行研究。FRANZEN 等[10] 以人造皮肤为模型，将同一浓度的咖啡因渗入到皮肤各层，并测定不同位置的拉曼光谱信号强度，分析咖啡因位于 556 cm^{-1}（$\nu_{O=C-N}$）处的特征峰和皮肤特征峰的差异，通过该特征单峰的强度变化对皮肤中不同深度的咖啡因浓度进行定量分析，提出了校正皮肤不同深度信号衰减的数学算法，可校正拉曼光谱信号随皮肤深度变化带来的信号衰减，为共聚焦拉曼光谱原位测定皮肤不同深度部位的目标物浓度提供了理论模型。文献[11] 采用主成分分析结合线性判别分析，研究了目标物咖啡因和丙二醇在皮肤中的最大渗透深度，计算得知皮肤中丙二醇的渗透深度比咖啡因更深。DOS SANTOS 等[12] 研究了不同年龄段人群皮肤中维生素 A 乙酸酯和醋酸生育酚的渗透情况，从皮肤表面到 25 μm 深处，逐点检测光谱信号，通过目标物单个特征峰的强度变化来研究其渗透情况，研究表明目标物浓度在年轻人群皮肤中的变化率比在老年人群皮肤中大。但该方法是采集单点的数据，不能实现目标物的可视化分析。TFAILI 等[13] 利用共聚焦拉曼光谱实时追踪了皮肤不同深度部位中咖啡因和白藜芦醇的浓度变化，结果显示咖啡因和白藜芦醇以不同的方式穿透表皮，同一深度的皮肤成分之间存在微观变异性，该模型可用来研究皮肤成分的微观变异性和目标物的扩散机制。DOS SANTOS 等[14] 利用共聚焦拉曼光谱和分子动力学模拟，研究了视黄醇乙酸酯在无渗透增强剂情况下在皮肤中的渗透行为。分子动力学计算结果和拉曼光谱检测实际结果都表明视黄醇乙酸酯能渗透到角质层，计算结果与实际结果能相互佐证。以上这些工作都集中于单轴 z 剖面研究，利用目标物与皮肤光谱的差异，通过某个特征峰的强度变化来确定目标物透皮浓度的变化，但都只能得到皮肤不同深度的一个单点的浓度数据。然而，皮肤结构是不均匀的，单点数据不一定能代表目标物渗透的实际浓度分布，因此该方法具有一定的局限性。

拉曼光谱成像能考察一个区域内目标物的浓度分布，因此采用拉曼光谱成像方法研究目标物的浓度分布更有意义。由于皮肤的本底信号比较高，待分析物的拉曼光谱信号大部分会和皮肤的信号重合，难以找到某个特征峰进行成像，单一指标很难解决实际问题。将光谱技术和数学手段相结合，引入多变量数据处理手段，在全光谱范围内提取多维信息，能实现皮肤中低含量目标物浓度分布的可视化成像分析。本研究采用多元线性回归建模，充分利用目标物及皮肤全光谱信息建立数学模型，计算目标物光谱对混合光谱的贡献系数，从而得到目标物的浓度贡献系数。

1　仪器与试药

LabRAM HR Evolution 型拉曼光谱仪（日本 Horiba 公司）；Leica CM 1950 型切片机（德国 Leica 公司）；KQ-200KDE 型高功率数控超声波清洗（HPLC）仪（昆山市超声仪器有限公司）；1260 型高效液相色谱仪（美国安捷伦科技有限公司）；TK-12D 型透皮扩散试验仪（上海锴凯科技贸易有限公司）；Himac CT15RE 型台式微量高速离心机（日本日立工机有限公司）；arium 611 DI 型超纯水设备（德国 Sartorius 公司）。

水杨酸粉末（批号 DGA21D0026S，上海麦克林生化科技有限公司）；透明质酸粉末（华熙福瑞达生物医药有限公司，相对分子质量为 1×10^4、4.3×10^4、1.5×10^5 以及 8.5×10^5）；猪皮（市售，未剃毛）；组织冷冻包埋液（德国 Leica 公司）；纯净水（电导率为 18.2 MΩ·cm）、0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液（PBS，用 0.1 mol/L 盐酸调至 pH 7.4）、2%水杨酸溶液及透明质酸溶液均为自制；胶带（美国 3M 公司）；无水乙醇为分析纯。

2 方法与结果

2.1 样品制备

挑选乳猪耳朵，剃除皮肤表面毛发，切成 2 cm×2 cm 的方块状，置 Franz 扩散池中，用移液枪将质量分数为 2%的水杨酸溶液 2 mL 涂抹在猪皮表面上，接收池中加入 PBS，扩散池温度设置为 32 ℃，接收池中转子转速为 300 r/min，4 h 后取出，用棉签移除表面剩余的样品。取新皮肤样品，同上涂上质量分数为 2%的透明质酸溶液，同法处理 24 h 后进行检测。空白组猪皮样品表面不涂抹目标物，同法处理。

将上述各组猪皮样品使用包埋液包埋，冷冻成型后放在冷冻切片台上固定，将皮肤切成厚度为 30 μm 的薄片，将薄片平铺在氟化钙玻片上，用拉曼光谱仪测试。

2.2 猪皮样品拉曼信号采集

将切好的样品放在光学检测平台上，采用面扫描（mapping）技术测试，区域设置为 21 μm×150 μm，横向采集 7 个点，纵向采集 50 个点，间距为 3 μm，共计 350 个点。工作参数为：*扫描波段*（光谱采集范围）400 ～ 2 000 cm^{-1}；*激光功率* 50 mV；*积分时间* 5 s；*激发光波长* 532 nm；*基底选择* 氟化钙；*目镜* ×50。

2.3 HPLC 检测用样品制备

照“**2.1**”项下方法制备猪皮样品，使用胶带粘贴猪皮表面，共粘贴 30 次，30 次后胶带上无明显角质细胞残留，精密称定粘贴操作前后猪皮的质量，计算差值，即得角质层的质量。丢弃第一和第二次粘贴的胶带（默认药物未渗透吸收）；将剩余胶带裁剪成小块，以去离子水 3 mL 提取药物。去除角质层的猪皮同上冷冻成型后平行切割成厚度为 70 μm 的薄片，将大部分的水挥发后，精密称定，再分别以去离子水 0.5 mL 提取药物。各组样品均连续超声 8 h，功率 100 W，将角质层及活性表皮层中的水杨酸提取出来。超声后的样品于 5 ℃离心（6 120×*g*）10 min，去除杂质。另分别制备质量浓度为 10 和 100 μg/mL 的水杨酸标样。

检测水杨酸的色谱条件：*色谱柱* Waters C_{18} 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；*流动相* 5 mmol/L 庚烷磺酸钠溶液和甲醇（体积比 55 ∶ 45）的混合溶液，等度洗脱；检测波长 261 nm［二极管阵列检测器（DAD）］；*流速* 1 mL/min；*柱温* 40 ℃；*进样量* 10 μL。

2.4 数据处理

由于皮肤本身由蛋白质、脂肪等组成，皮肤自身的拉曼光谱具有丰富的指纹信息。因此要将目标物的指纹信息从皮肤的指纹信息中提取出来，需要采用合适的计算方法。包含目标物的皮肤光谱同样是一个多组分混合样本，通过对混合样本及其所含纯物质样本进行相应的拉曼光谱测量，根据朗伯 - 比尔定律的加和原理，可得到式①描述的数学模型。

$$y=[x_1, x_2, \ldots, x_n]\begin{bmatrix} c_1 \\ c_2 \\ \vdots \\ c_n \end{bmatrix}=X\beta \qquad ①$$

式中：y 为混合物光谱；x_n（n=1、2、3…）为纯物质光谱；X 为纯光谱矩阵；β 为物质的贡献系数向量。式①可利用普通最小二乘法进行求解，结果为 $\beta=(X^Tx)^{-1}X^Ty$。式中：T 为矩阵的转置。但是，通过普通最小二乘法求得的 β 可能为负值，这与实际不符，因为一个物质的拉曼光谱贡献系数最小为 0，不会是负值。因此对回归系数进行约束，使得系数不出现负值，保证计算结果更符合实际情况。采用 Matlab R2021b 程序，根据上述公式计算目标物质的浓度贡献系数，所得系数与浓度呈正相关，将此系数以热图的形式呈现，就可得到待测物的相对浓度在猪皮中的分布图。

2.5 皮肤聚类分析

采用面扫描技术采集到的皮肤剖面拉曼光谱如

图 1A 所示，可见大量的谱图堆积在一起，难以区分。从皮肤表皮层（角质层、活性表皮层）和真皮层各提取一张代表性拉曼光谱（如图 1B 所示），可见 3 张光谱的相似度较高，但在 748、854、936 cm^{-1} 等处的谱峰具有一定的差异，但也难以通过某一个特征峰实现皮肤结构的分类。因此，本研究使用 k 均值聚类算法[15]对皮肤表皮层（角质层、活性表皮层）和真皮层进行聚类分析。

光谱预处理对皮肤的聚类分析影响十分明显，本研究着重讨论了宇宙射线移除以及背景校正对聚类分析的影响。宇宙射线是拉曼光谱仪随机从宇宙中接收的信号（如图 2A 中尖峰所示），在聚类分类中易被误判为一个谱峰，从而对光谱之间的相关系数产生较大影响。在面扫描数据采集过程中，由于持续时间较长，宇宙射线在光谱采集过程中难以避免。图 2A 是原始采集光谱，可以看出，宇宙射线是随机分布在谱图上的，且数量较多。

采用原始数据得到的皮肤聚类图和光学显微镜叠加图如图 3A 所示，从聚类图上可以看出，最上层的角质层厚度超过 60 μm，严重偏离了皮肤光学显微照片中的角质层厚度。此外，活性表皮层和真皮层重叠在一起，没有分开，说明宇宙射线对聚类分析结果影响很大。图 2B 和图 3B 是去除宇宙射线后的光谱图和叠加图。从图 3B 可见，去除宇宙射线后的皮肤聚类更加清晰，且各层的厚度也与光学图片中的厚度较接近，但聚类分析结果与光学图

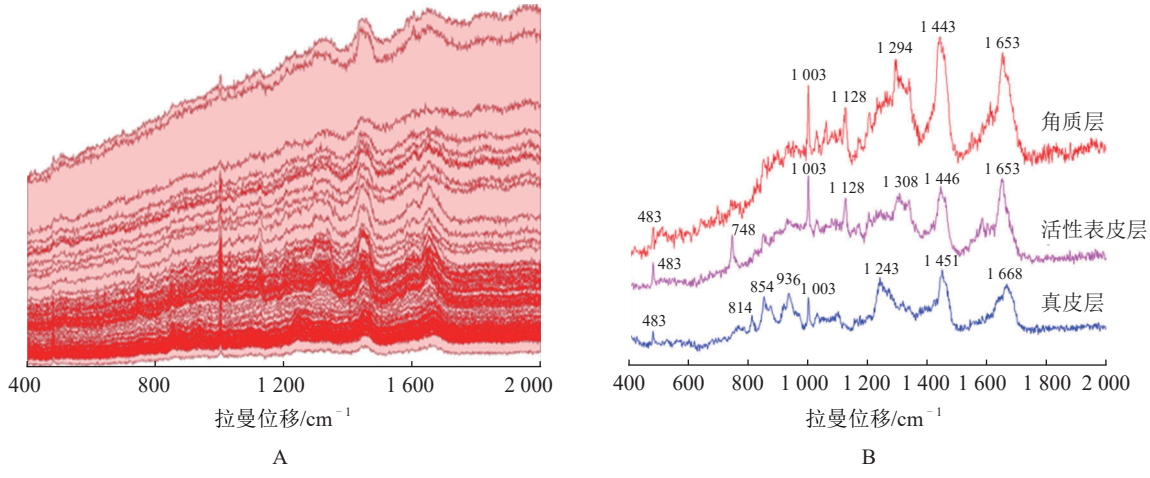


图 1　皮肤的拉曼光谱（A）和皮肤结构的代表性拉曼光谱（B）

Fig.1　Raman Spectra of Skin (A) and Representative Raman Spectra of Skin Structures (B)

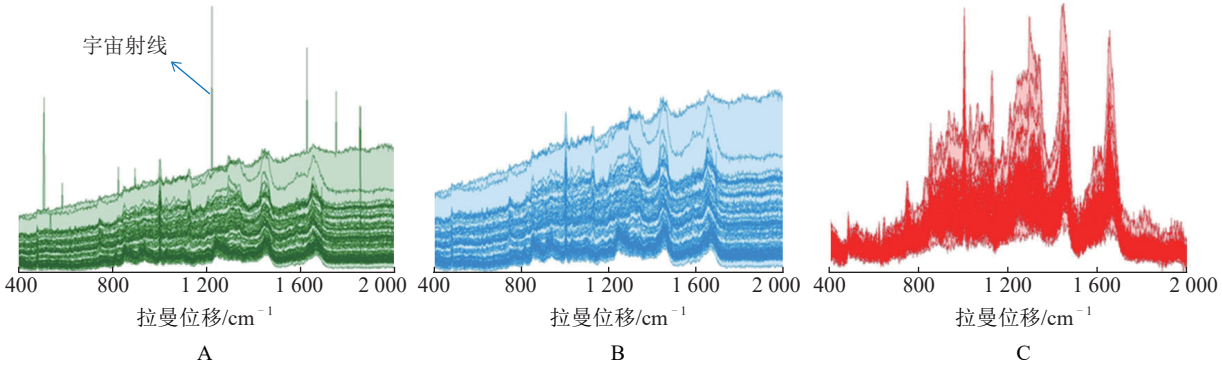


图 2　含有宇宙射线的皮肤光谱（A）、去除宇宙射线后的皮肤光谱（B）以及经基线校正后的皮肤光谱（C）

Fig.2　Skin Spectra with Cosmic Rays (A), Skin Spectra after Removal of Cosmic Rays (B) and Skin Spectra after Baseline Correction (C)

片依然存在差异。进一步对光谱进行基线校正处理，校正后的光谱图和叠加图分别如图 2C 和图 3C 所示，可见皮肤结构的聚类分析结果得到了进一步改善，角质层和活性表皮层的分隔线以及活性表皮层和真皮层的分隔线已经和光学图片基本吻合，通过光谱聚类分析结果获得的皮肤结构与显微照片基本重合，说明 k 均值聚类分析能较好地对皮肤结构进行聚类分析，同时也说明光谱前处理对数据分析非常重要。

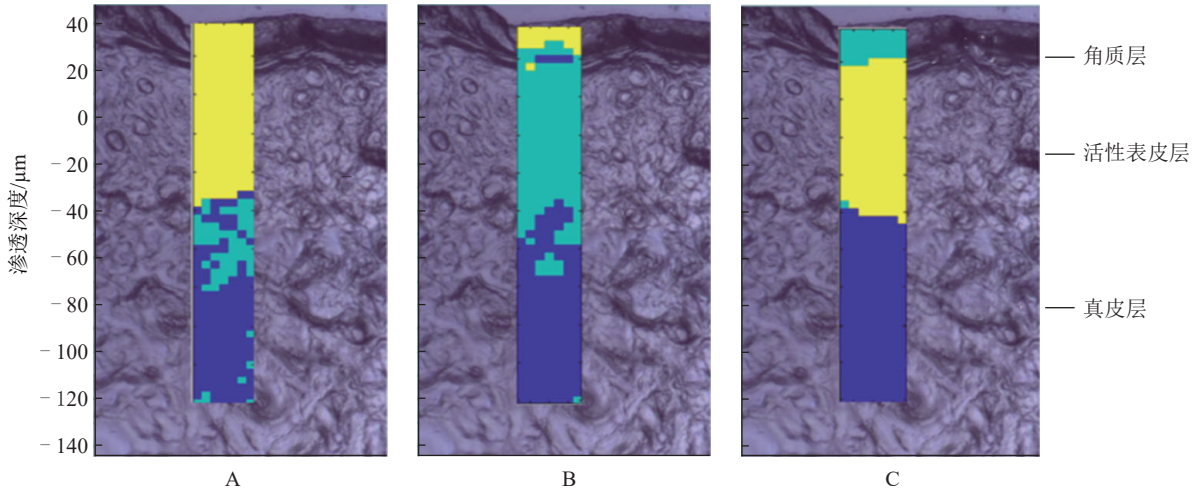
2.6 水杨酸在皮肤中的渗透分布分析

以水杨酸为目标物，分别采用拉曼光谱成像技术与 HPLC 法分析角质层与活性表皮层中的目标物浓度。水杨酸及经水杨酸处理的皮肤样品的拉曼光谱图如图 4 所示。由图 4A 可见水杨酸的特征拉曼谱峰非常明显。采用上述数据处理方法，2 组平行试验中水杨酸在皮肤中浓度分布的拉曼光谱成像图如图 5 所示。可见，2 组试验所得的分布图相似，水杨酸主要聚集在角质层和活性表皮层，少量渗透到真皮层，这说明水杨酸能穿透角质层，且试验重复性较好。市售水杨酸产品的主要作用为去除角质层死细胞、皮脂和油，因此主要在角质层中发挥药效。本试验结果显示，水杨酸的作用部位与药效部位较相符。

为了验证拉曼成像结果的可靠性，本研究同时采用传统的胶带剥离结合 HPLC 法测定皮肤中的水杨酸。试验结果如表 1 所示，HPLC 法测得的 2 次平行试验结果重复性较好，角质层中目标物的渗透量大约为 8.06 和 9.50 mg/g，活性表皮层中目标物的渗透量大约为 0.63 和 0.74 mg/g；照式①计算目标物在拉曼光谱成像中的浓度贡献系数，2 次平行试验所得角质层中的结果为 0.231%和 0.275%（如表 1 所示），活性表皮层中的结果为 3.1×10^{-4} 和 2.4×10^{-4}。将 HPLC 结果与拉曼光谱成像结果进行对比分析可知，拉曼光谱成像技术可用于半定量分析。而拉曼光谱成像法的优势在于操作更简便、分析速度更快，能更直观地反映物质的实际分布，可用于处方的快速优化。

2.7 拉曼光谱成像用于透明质酸的渗透分析

透明质酸是一种亲水的线性多糖，它是由多个 D- 葡萄糖醛酸和 D-*N*- 乙酰葡萄糖胺相连组成的双糖通过交替的 β-1,4 和 β-1,3 糖苷键聚合而成，具有显著的黏弹性和保水性能，被广泛用于药品和化妆品中[16—18]。由于透明质酸结构的复杂性，采用传统方法[19]进行分析较困难。本研究将拉曼光谱成



A：由原始光谱（未经处理）获得的皮肤聚类图与光学显微照片的叠加，B：由去除宇宙射线的光谱获得的皮肤聚类图与光学显微照片的叠加图，C：由去除宇宙射线并经基线校正后的光谱获得的皮肤聚类图与光学显微照片的叠加图

图 3 不同方法获得的聚类图与皮肤结构光学显微照片的叠加图

Fig.3 Stacking Charts of Clustering Plots Obtained with Different Methods and Optical Microscopic Images of Skin Structure

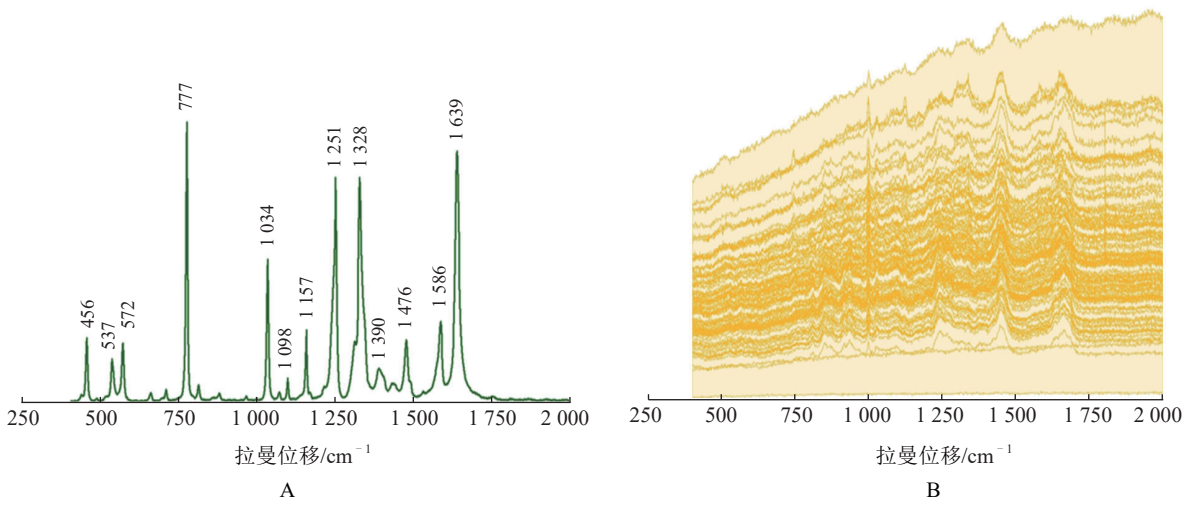


图 4　水杨酸的拉曼光谱（A）以及含水杨酸的皮肤样品的拉曼光谱（B）

Fig.4　Raman Spectrum of Salicylic Acid (A) and Raman Spectra of Skin Samples Containing Salicylic Acid (B)

表 1　不同方法所得的皮肤中水杨酸浓度（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Tab.1　Concentrations of Salicylic Acid in the Skin Obtained with Different Methods ($\bar{x}\pm s$, n=3)

皮层	水杨酸总质量/μg	皮层质量/mg	HPLC浓度/(mg·g^{-1})	浓度贡献系数×10^{-3}
角质层1	12.10±1.85	1.51±0.32	8.06±0.87	2.31±0.63
活性表皮层1	6.31±0.85	9.91±1.01	0.63±0.07	0.31±0.07
角质层2	11.40±1.56	1.20±0.21	9.50±0.96	2.75±0.57
活性表皮层2	7.20±0.88	9.74±0.98	0.74±0.08	0.24±0.05

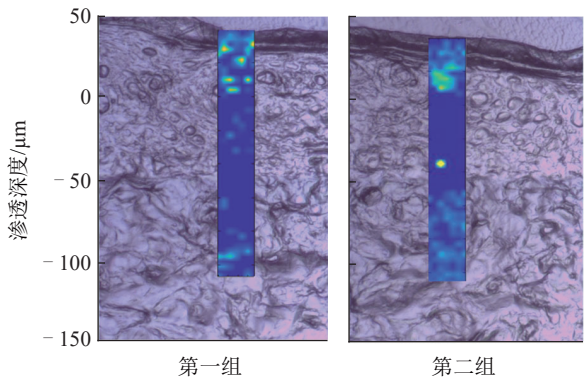
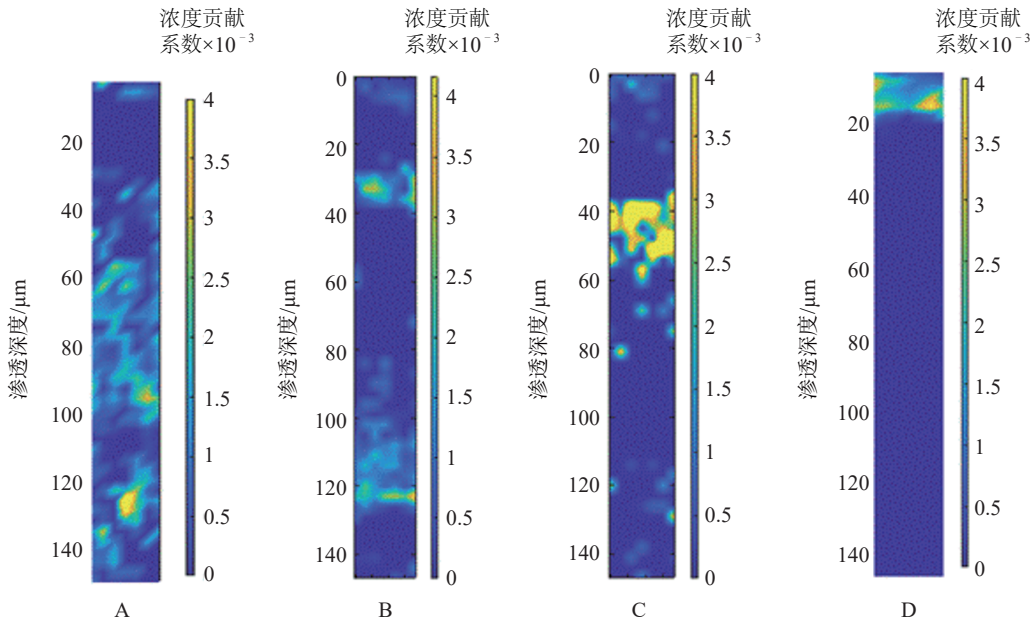


图 5　2 组皮肤样品中水杨酸浓度分布的聚类图与皮肤结构光学显微照片的叠加图

Fig.5　Stacking Charts of Clustering Plots of Salicylic Acid Concentration Distribution in Skin Samples of Two Groups and Optical Microscopic Images of Skin Structure

像法用于透明质酸在皮肤中的渗透行为分析，以期为大分子的经皮渗透分析提供新的技术手段。首先，采用如上拉曼光谱成像技术研究不同相对分子质量的透明质酸在皮肤中的渗透情况，结果如图 6 所示。相对分子质量为 1×10^4 的透明质酸在皮肤中渗透深度可到达真皮层（140 μm），在皮肤层内的分布也比较均匀（图 6A）。从图 6B 可见，相对分子质量为 4.3×10^4 的透明质酸渗透深度也可到达真皮层（120 μm），但与图 6A 相比，可见皮内出现了局部富集情况，渗入的透明质酸也相对较少。随着相对分子质量进一步加大，局部富集趋势更明显（图 6C 和 6D），同时进入到皮内的含量更少，当相对分子质量达到 8.5×10^5 时，目标物基本集中在角质层，难以渗透到皮肤内部（图 6D）。

由此可见，相对分子质量低的透明质酸在皮肤中具有更好的渗透能力。本试验中，相对分子质量低于 4.3×10^4 的透明质酸的渗透效果良好。当相对分子质量增加到 1.5×10^5 时，渗透速率明显下降，透明质酸大部分集中在活性表皮层，渗透能力明显减小；但同时也说明仍有部分可以穿透角质层。当进一步增加到 8.5×10^5 时，目标物基本在角质层中聚集，在没有促渗剂时难以穿透角质层。综上所述，



A—1×10^4；B—4.3×10^4；C—1.5×10^5；D—8.5×10^5

图 6 不同相对分子质量的透明质酸在皮肤中的渗透深度及分布

Fig.6 Permeability Depths and Distributions in Skin of Hyaluronic Acid with Different Relative Molecular Weights

透明质酸的相对分子质量越小，对皮肤的渗透作用越强、渗透深度越深。同时提示相对分子质量小于1.5×10^5的目标物可以穿透角质层。拉曼光谱成像中，不同相对分子质量透明质酸在皮肤中的浓度贡献系数如表 2 所示。

表 2 不同相对分子质量透明质酸在皮肤中的浓度贡献系数

Tab.2 Concentration Contribution Coefficients of Hyaluronic Acid with Different Relative Molecular Weights in Skin

皮层	相对分子质量			
	1×10^4	4.3×10^4	15×10^4	85×10^4
角质层	1.75×10^{-3}	1.82×10^{-3}	0.26×10^{-3}	2.12×10^{-3}
活性表皮层	2.95×10^{-3}	1.04×10^{-3}	3.24×10^{-3}	0.11×10^{-3}

3 结论

本研究围绕皮肤中药物分子分布的可视化分析展开研究，介绍了一种基于拉曼光谱成像的快速分析方法。此工作采用映射技术采集皮肤剖面的拉曼光谱，建立光谱信号强度与目标物浓度的多元线性回归模型，通过 Matlab 程序计算得到皮肤中目标物的浓度贡献系数，并将浓度系数以热图的形式显示出来，实现了皮肤中目标物浓度分布的可视化分析。将拉曼光谱分析结果进一步与 HPLC 法结果进行对比分析，验证了分析结果的可靠性。与传统方法相比，该方法不仅实现了皮肤中目标物的可视化分析，更直观、简便、快速，也适于分析一些不适合采用传统胶带剥离 - 液相色谱法的化合物。

参考文献：

[1] ADLHART C, BASCHONG W. Surface distribution and depths profiling of particulate organic UV absorbers by Raman imaging and tape stripping [J]. *Int J Cosmet Sci*, 2011, **33**(6): 527-534.

[2] WAGNER H, KOSTKA K H, LEHR C M, *et al*. Drug distribution in human skin using two different *in vitro* test systems: comparison with *in vivo* data [J]. *Pharm Res*, 2000, **17**(12): 1475-1481.

[3] BENITO-GONZÁLEZ I, MARTÍNEZ-SANZ M, LÓPEZ-RUBIO A, *et al*. Confocal Raman imaging as a useful tool to understand the internal microstructure of multicomponent aerogels [J]. *J Raman Spectrosc*, 2020, **51**(10): 2022-2035.

[4] BEN GOUIDER TRABELSI A, V KUSMARTSEV F, KUSMARTSEVA A, *et al*. Raman spectroscopy imaging of exceptional electronic properties in epitaxial graphene grown on SiC [J]. *Nanomaterials* (Basel), 2020, **10**(11): 2234.

[5] DAI X, SONG Z L, SONG W, *et al*. Shell-switchable SERS blocking strategy for reliable signal-on SERS sensing in living cells: detecting an external target without affecting the internal Raman molecule [J]. *Anal Chem*, 2020, **92**(16): 11469-11475.

[6] KROMBHOLZ R, LUNTER D. A new method for *in-situ* skin penetration analysis by confocal raman microscopy [J]. *Molecules*, 2020, **25**(18): 4222.

[7] ALONSO C, CARRER V, BARBA C, *et al*. Caffeine delivery in porcine skin: a confocal Raman study [J]. *Arch Dermatol Res*, 2018, **310**(8): 657-664.

[8] PYATSKI Y, ZHANG Q, MENDELSOHN R, *et al*. Effects of permeation enhancers on flufenamic acid delivery in *ex vivo* human skin by confocal Raman microscopy [J]. *Int J Pharm*, 2016, **505**(1/2): 319-328.

[9] LUNTER D J. How confocal is confocal Raman microspectroscopy on the skin? Impact of microscope configuration and sample preparation on penetration depth profiles [J]. *Skin Pharmacol Physiol*, 2016, **29**(2): 92-101.

[10] FRANZEN L, SELZER D, FLUHR J W, *et al*. Towards drug quantification in human skin with confocal Raman microscopy [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2013, **84**(2): 437-444.

[11] MUJICA ASCENCIO S, CHOE C, MEINKE M C, *et al*. Confocal Raman microscopy and multivariate statistical analysis for determination of different penetration abilities of caffeine and propylene glycol applied simultaneously in a mixture on porcine skin *ex vivo* [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2016, **104**: 51-58.

[12] DOS SANTOS L, TIPPAVAJHALA V K, MENDES T O, *et al*. Evaluation of penetration process into young and elderly skin using confocal Raman spectroscopy [J]. *Vib Spectrosc*, 2019, **100**: 123-130.

[13] TFAILI S, JOSSE G, ANGIBOUST J F, *et al*. Monitoring caffeine and resveratrol cutaneous permeation by confocal Raman microspectroscopy [J]. *J Biophotonics*, 2014, **7**(9): 676-681.

[14] DOS SANTOS L, TÉLLEZ S C A, SOUSA M P J, *et al*. *In vivo* confocal Raman spectroscopy and molecular dynamics analysis of penetration of retinyl acetate into stratum corneum [J]. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2017, **174**: 279-285.

[15] 孙家政, 姜　红, 刘新磊, 等. 差分拉曼光谱技术结合K-means聚类法对牙膏的快速分类[J]. 理化检验-化学分册, 2022, **58**(1): 84-89.

[16] ZUCCHI A, SCROPPO F I, CAPOGROSSO P, *et al*. Clinical use of hyaluronic acid in andrology: a review [J]. *Andrology*, 2022, **10**(1): 42-50.

[17] SUN J, HAN L, ZHANG S. Hyaluronic acid prodrug micelles for tumour therapy [J]. *J Drug Target*, 2022, **30**(1): 22-30.

[18] 崔　媛, 段　潜, 李艳辉. 透明质酸的研究进展[J]. 长春理工大学学报(自然科学版), 2011, **34**(3): 101-106.

[19] ZHANG C, ZHANG K, ZHANG J, *et al*. Skin delivery of hyaluronic acid by the combined use of sponge spicules and flexible liposomes [J]. *Biomater Sci*, 2019, **7**(4): 1299-1310.