

• 药剂与工艺 •

紫草素脂质纳米粒的制备、表征和透皮性能研究

张俏菊¹, 郑俊侨¹, 禹佳惠¹, 彭睿翔¹, 刘冬榕^{2*}, 时 军^{1,3*}

1. 广东药科大学中药学院, 广东 广州 510006

2. 广州松田职业学院, 广东 广州 511300

3. 广东省药物制剂研究与评价重点实验室, 广东 广州 510006

摘要: 目的 制备紫草素脂质纳米粒 (shikonin lipid nanoparticles, Shi-LNPs), 进行相关表征及体外透皮性能研究。方法 采用高速搅拌超声法制备 Shi-LNPs, 通过静电吸附法对其进行壳聚糖修饰, 得到壳聚糖修饰的紫草素脂质纳米粒 (chitosan-modified shikonin lipid nanoparticles, CS@Shi-LNPs)。通过外观与形貌观察、粒径、多分散指数 (polydispersity index, PDI)、 ζ 电位测定、差示扫描量热法 (differential scanning calorimetry, DSC) 以及 X 射线衍射 (X-ray diffraction, XRD) 研究等表征手段, 对所得制剂进行质量评价; 采用动态透析法与仿生膜法 2 种方法考察 CS@Shi-LNPs 的体外释药行为; 其次, 采用 Franz 扩散池法考察 CS@Shi-LNPs 的经皮渗透能力及真皮滞留性能。**结果** CS@Shi-LNPs 封装率为 (99.22 \pm 0.09)%, 载药量为 (1.65 \pm 0.12)%。该纳米粒为均一液体, 具有丁达尔效应, 在透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) 下外形圆整、分散均匀, 平均粒径为 (184.7 \pm 4.6) nm, PDI 为 0.255 \pm 0.023, 壳聚糖修饰前平均 ζ 电位为 (-33.15 \pm 0.59) mV, 修饰后平均 ζ 电位为 (5.22 \pm 0.08) mV, 为正电荷, 表明壳聚糖成功修饰到 Shi-LNPs 颗粒上。DSC 与 XRD 结果表明, 紫草素被包裹于脂质中形成 LNPs, 呈无定形态, CS@Shi-LNPs 成功制备。体外释药实验显示, CS@Shi-LNPs 具备缓控释释药特性, 考察其 30 h 累积释放率, 结果 2 种方法的累积释放率分别为 (62.39 \pm 9.08)% 和 (56.92 \pm 1.97)%, 体外透皮实验表明, CS@Shi-LNPs 中紫草素在 30 h 内累积渗透量为 (14.27 \pm 1.58) μ g/cm², 相比 Shi-LNPs 均有所提高。**结论** Shi-LNPs 处方工艺合理, 具有良好的透皮性能和真皮滞留性能。

关键词: 紫草素; 脂质纳米粒; 透皮吸收; 差示扫描量热法; X 射线衍射

中图分类号: R283.6

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2024)23-7969-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.23.005

Preparation, characterization and transdermal properties of shikonin lipid nanoparticles

ZHANG Qiaojun¹, ZHENG Junqiao¹, YU Jiahui¹, PENG Ruixiang¹, LIU Dongrong², SHI Jun^{1,3}

1. School of Chinese Materia Medica, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

2. Guangzhou Songtian Polytechnic College, Guangzhou 511300, China

3. Guangdong Provincial Key Laboratory for Research and Evaluation of Pharmaceutical Preparations, Guangzhou 510006, China

Abstract: Objective To prepare the lipid nanoparticles of shikonin (Shi-LNPs) and study its characterization and the osmotic dynamics of *in vitro* skin. **Methods** Shikonin lipid nanoparticles were prepared by high-speed stirring sonication and modified with chitosan (CS) by electrostatic adsorption to obtain CS@Shi-LNPs. Characterization tools including appearance and morphology, particle size, polydispersity index (PDI), ζ potential measurement, differential scanning calorimetry (DSC) and X-ray diffraction (XRD) studies were used to evaluate the quality of the resulting formulations. Dynamic dialysis and biomimetic membrane were used to investigate the *in vitro* drug release behavior of CS@Shi-LNPs. The Franz diffusion pool method was used to investigate the

收稿日期: 2024-06-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82173982); 广东省自然科学基金资助项目 (2022A1515011382)

作者简介: 张俏菊 (1999—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药制剂研究与开发。E-mail: Qiaojun0911@163.com

*通信作者: 时 军 (1980—), 男, 博士, 教授, 研究方向为纳米经皮给药系统及瘢痕的中医药防治。E-mail: shijun8008@163.com

刘冬榕 (1997—), 女, 硕士, 研究方向为中药制剂研究与开发。E-mail: liudongrong1117@163.com

transdermal permeability and dermal retention properties of CS@Shi-LNPs. **Results** The CS@Shi-LNPs encapsulation rate was of $(99.22 \pm 0.09)\%$ and drug loading of $(1.65 \pm 0.12)\%$. The nanoparticles are homogeneous liquid with Tyndall effect, rounded shape and uniform dispersion under transmission electron microscope (TEM), with an average particle size of (184.7 ± 4.6) nm and PDI of 0.255 ± 0.023 . The average ζ potential was (-33.15 ± 0.59) mV before chitosan modification, and the average ζ potential was positively charged to (5.22 ± 0.08) mV after modification, indicating successful modification of chitosan onto Shi-LNPs particles. DSC and XRD results showed that shikonin was encapsulated in the lipid to form LNPs in an amorphous state. CS@Shi-LNPs was successfully prepared. The *in vitro* drug release experiments showed that CS@Shi-LNPs possessed the characteristics of slow and controlled release, with the cumulative release rates of $(62.39 \pm 9.08)\%$ and $(56.92 \pm 1.97)\%$ for 30 h, respectively. The *in vitro* permeation experiments showed that the cumulative permeation amount of shikonin in CS@Shi-LNPs at 30 h was (14.27 ± 1.58) $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, both of which were increased compared to Shi-LNPs. **Conclusion** The Shi-LNPs prescription process is reasonable and has good transdermal properties and dermal retention properties.

Key words: shikonin; lipid nanoparticles; transdermal absorption; differential scanning calorimetry; X-ray diffraction

紫草 *Arnebiae Radix* 是中医临床治疗银屑病之要药,《中国药典》2020 年版记载其可清热凉血、活血解毒、透疹消斑,银屑病血热证治疗名方“凉血活血汤”便以其为君药^[1-2]。紫草素(shikonin)是紫草重要脂溶性成分,具有抗炎、抑菌、抗肿瘤、调节免疫等药理作用,是紫草治疗银屑病的有效成分之一^[3-5]。紫草素对银屑病虽有较大的治疗价值,但由于脂溶性强、微溶于水的溶解特性,口服时生物利用度较低。紫草素注射液可用于银屑病的治疗,具有较好的治疗效果,但注射液使用时易引发疼痛与不良反应^[6]。银屑病是临床常见的慢性皮肤性疾病,俗称“牛皮癣”。长期局部经皮用药是治疗银屑病的主要方式。目前治疗银屑病的外用药物主要有糖皮质激素、维 A 酸类等药物,常用制剂包括糊剂、乳膏、凝胶等,但此类制剂通过表皮角质层的渗透性差,需要 1 d 内重复以及高剂量应用,并且长期使用此类药物容易导致皮肤萎缩、痤疮、色素沉着、皮肤刺激性等副作用^[7-8]。因此研究开发更多安全有效、方便经济的治疗银屑病的紫草素外用药物制剂具有重要意义。

透皮给药系统(transdermal drug delivery system, TDDS)是指将药物分子通过皮肤递送,产生局部或全身治疗作用的途径,在治疗皮肤病方面具有优势^[9]。透皮给药可以将药物分子集中在特定的皮肤区域来提高生物利用度,是治疗药物给药侵入性最小且对患者友好的方式之一^[10]。但 TDDS 的主要挑战在于如何克服具有复杂屏障功能的角质层对药物吸收的阻碍作用。因此克服角质层屏障是提高药物经皮渗透的攻克点,同时增强药物的皮肤渗透能力也是治疗银屑病的关键问题之一。脂质纳米颗粒(lipid nanoparticles, LNPs)在真皮和透皮药物递送方面展示出较大的前景。由于脂质纳米粒粒径

小、柔韧性好而有利于穿过皮肤角质层中的细胞外基质,促进药物通过皮肤渗透,同时可持续释放药物,达到控释和增效的治疗效果,适合局部用于受损或发炎皮肤^[11]。本课题依托 LNPs 在治疗炎症性皮肤病疾病中的优势,成功制备了壳聚糖修饰的紫草素脂质纳米粒(chitosan-modified shikonin lipid nanoparticles, CS@Shi-LNPs),改进其成药性,显著提高紫草素的生物利用度和生物相容性,改善其经皮渗透性能,为其更好地治疗银屑病提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

BSA124S 型万分之一天平,北京赛多利斯仪器系统有限公司;MS-H-pro 型磁力搅拌器,美国赛洛捷克公司;JY-96IIN 型超声波细胞粉碎机,宁波新芝生物科技股份有限公司;TGL-16 型高速离心机,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;UltiMate 3000 型高效液相色谱仪系统,美国赛默飞世尔科技公司;单通道移液枪,北京赛多利斯仪器系统有限公司;FD-1A50 型冷冻干燥机,北京博医康实验仪器有限公司;BT100-2J 型蠕动泵,保定兰格恒流泵有限公司;STA 449F3 型同步热分析仪,德国耐驰仪器制造有限公司;HT-7800 型透射电子显微镜(TEM),日本 HiTachi 公司;Delsa Nano C 型粒度电位仪,美国 Beckman Coulter 公司;D8 Advance X 型射线衍射仪,德国 Bruker AXS 公司;雷磁 PHS-25 pH 计,上海仪电科学仪器股份有限公司;MS-H-pro 型磁力搅拌器,美国赛洛捷克公司;TP-6 型透皮扩散仪,天津市精拓仪器科技有限公司;TGL-16 型高速离心机,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司。

1.2 材料

紫草素原料药,质量分数 $>98\%$,批号 YRZ017-220701,成都仪睿生物科技有限公司;紫草素对照

品, 质量分数 >98%, 批号 PS013058, 成都普思生物科技股份有限公司; 油酸 (批号 60148)、乙醇 (体积分数 95%), 天津市致远化学试剂有限公司; 大豆卵磷脂 (质量分数 >90%, 批号 C15210747)、聚山梨酯-80 (批号 C14134834)、壳聚糖 (相对分子质量 100 000), 上海麦克林生化科技有限公司; 单硬脂酸甘油酯, 批号 20181007, 天津市永大化学试剂有限公司; 乙酸, 批号 20181003, 广州化学试剂厂; Amicon Ultra-10 超滤管, 截留相对分子质量 10 000、30 000、50 000, 美国 Millipore 公司; 氯化钠, 批号 20220701, 天津市大茂化学试剂厂; 色谱乙腈, 瑞典 Oceanpak 公司; Logan Permeafilm 仿生膜, 上海禄巨仪器设备有限公司。

1.3 动物

健康 Sprague Dawley (SD) 大鼠 6 只, 清洁级, 雌性, 体质量 (200 ± 10) g, 由南方医科大学提供, 生产许可证号: SCXK (粤) 2021-0041, 动物实验经广东药科大学动物研究伦理委员会批准 (批准号 SPF2022180)。

2 方法与结果

2.1 Shi-LNPs 的制备

采用高速搅拌超声法预先制备 Shi-LNPs。选用单硬脂酸甘油酯作为处方中的固体脂质, 油酸为液体脂质, 两者的比例是影响 LNPs 成型的重要因素。固定总脂质质量为 200 mg, 分别按 1 : 4 和 4 : 1 的

固-液脂质比称取相应的固体及液体脂质。精密称取 10.0 mg 紫草素原料药, 溶于 5 mL 乙醇中。将紫草素乙醇溶液与总脂质混和, 作为油相, 置于 75 °C 水浴中加热, 备用。精密称取 25.0 mg 大豆卵磷脂溶于 10 mL 1% 聚山梨酯-80 水溶液中, 为水相, 同样于 75 °C 水浴加热。在 1 000 r/min 磁力搅拌条件下, 使用移液枪将油相缓慢加入水相中, 滴加完毕后, 持续搅拌 30 min。搅拌结束后, 将所得初乳置于超声波细胞粉碎机内, 使用超声探头 (200 W, 超声 3 s, 间隔 2 s) 超声 10 min 调整粒径, 随后将样品过 0.45 μm 微孔滤膜, 即得 Shi-LNPs 混悬液。于 4 °C 冰箱中保存备用。除不加入紫草素原料药外, 同上述方法制备空白脂质纳米粒 (blank-LNPs, B-LNPs)。

2.2 CS@Shi-LNPs 的制备

使用静电吸附法制备 CS@Shi-LNPs。精密称取 50.0 mg 壳聚糖于烧杯中, 加入 100 mL 1% 乙酸溶液, 于 500 r/min 磁力搅拌条件下搅拌 30 min, 得壳聚糖原液。保持 500 r/min 磁力搅拌条件, 以 2 滴/s 的速度向壳聚糖原液中缓慢滴加 Shi-LNPs 混悬液, 混悬液与壳聚糖原液的体积比为 1 : 1, 滴加完毕后持续搅拌 30 min, 随后使用超声探头 (200 W, 超声 3 s, 间隔 2 s) 超声 5 min 调整样品粒径, 过 0.45 μm 微孔滤膜后, 得 CS@Shi-LNPs 混悬液。CS@Shi-LNPs 制备流程见图 1。

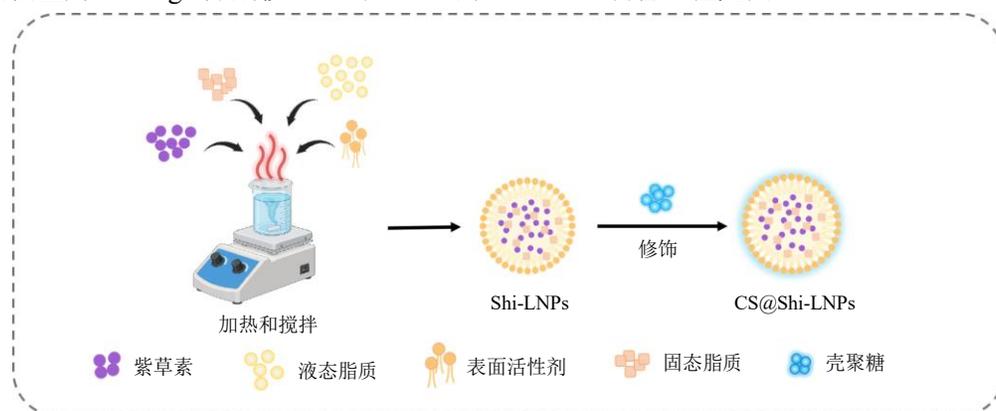


图 1 CS@Shi-LNPs 制备流程

Fig. 1 Preparation flow of CS@Shi-LNPs

2.3 紫草素含量测定

2.3.1 对照品溶液的制备 精密称取紫草素对照品 10.0 mg 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 得 1.00 mg/mL 紫草素对照品溶液。

2.3.2 供试品溶液的制备 精密吸取 1.0 mL Shi-LNPs 混悬液置于 25 mL 量瓶中, 加入甲醇 10 mL,

于 60 °C 水浴破乳 10 min, 放冷至室温后, 用流动相定容至刻度。用注射器吸取 1 mL, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 作为供试品溶液。同法制备 B-LNPs 供试品溶液和 CS@Shi-LNPs 供试品溶液。

2.3.3 色谱条件 色谱柱为 Ecosil C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为 0.2% 甲酸水溶液-乙腈

(30 : 70), 等度洗脱; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 275 nm; 柱温 30 °C; 进样量 10 μ L。

2.3.4 专属性考察 分别取“2.3.2”项下的 B-LNPs、Shi-LNPs、CS@Shi-LNPs 供试品溶液及“2.3.1”项下的紫草素对照品溶液, 过 0.45 μ m 微孔滤膜, 按“2.3.3”项下色谱条件进样分析, 考察系统专属性。系统专属性考察结果如图 2 所示。由色谱峰结果图可知, 紫草素保留时间为 (7.256 \pm 0.004) min, 峰形稳定, 分离度良好, 药物测定不受辅料干扰, 理论塔板数不低于 8 000, 符合实验要求。

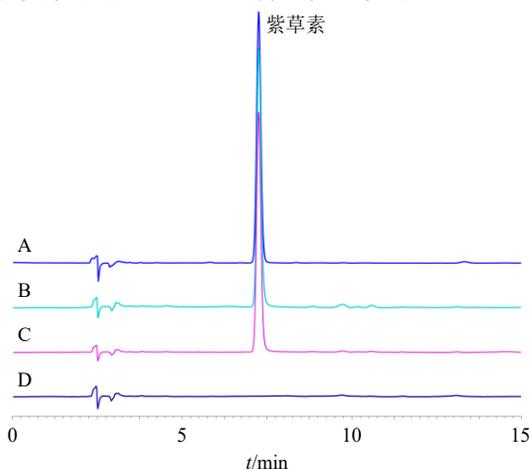


图 2 紫草素对照品 (A)、Shi-LNPs (B)、CS@Shi-LNPs (C) 和 B-LNPs (D) 的 HPLC 图

Fig. 2 HPLC of shikonin reference substance (A), Shi-LNPs (B), CS@Shi-LNPs (C) and B-LNPs (D)

2.3.5 线性关系考察 精密吸取适量“2.3.1”项下对照品溶液于 10 mL 量瓶中, 加入甲醇, 依次稀释为 400.00、200.00、40.00、8.00、1.60、0.32 μ g/mL 的对照品溶液。取上述溶液过 0.45 μ m 微孔滤膜, 按“2.3.3”项下色谱条件进样测定。以峰面积为纵坐标 (A), 紫草素对照品溶液质量浓度为横坐标 (C), 绘制标准曲线, 进行线性回归, 得线性回归方程为 $A=0.2824C+0.0018$, $r=1.0000$, 结果表明紫草素在 0.32~400.00 μ g/mL 线性关系良好。

2.3.6 精密度考察 将紫草素对照品储备液稀释为高 (200.00 μ g/mL)、中 (40.00 μ g/mL)、低 (8.00 μ g/mL) 3 个质量浓度, 1 d 内重复进样 3 次, 计算日内精密度 RSD, 连续测定 3 d, 计算日间精密度 RSD。计算所得日内精密度的 RSD 分别为 0.06%、0.26%、0.31%, 日间精密度的 RSD 分别为 0.29%、0.88%、1.25%, 结果表明仪器具有良好的精密度。

2.3.7 稳定性考察 取 Shi-LNPs 供试品溶液, 分别于制备后 0、3、6、12、18、24 h 进样测定, 记录紫

草素色谱峰的峰面积, 并计算峰面积的 RSD 值。计算得到 RSD 值为 1.63%, 小于 2%, 结果表明供试品溶液在 24 h 内检测稳定性良好。

2.3.8 重复性考察 取同一批制备的 Shi-LNPs 混悬液, 按“2.3.2”项下方法分别制成 6 份供试品溶液, 进样测定紫草素峰面积, 计算其质量浓度的 RSD 为 0.73%, 表明该方法重复性良好。

2.3.9 加样回收率考察 取 9 份同一批制备的 Shi-LNPs 混悬液, 精密吸取 1.0 mL 于 25 mL 量瓶中, 分为高、中、低质量浓度 3 组, 每组 3 份, 各加入 1.0 mL 高 (200.00 μ g/mL)、中 (40.00 μ g/mL)、低 (8.00 μ g/mL) 质量浓度的对照品溶液, 按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液, HPLC 法进样测定, 计算加样回收率。计算得出紫草素的平均加样回收率为 101.17%, RSD 为 1.56%, 符合检测要求。

2.3.10 超滤管回收率考察 分别取质量浓度为 200.00、40.00、8.00 μ g/mL 的对照品溶液各 400 μ L, 加入到截留相对分子质量 (M_w) 分别为 10 000、30 000、50 000 的超滤离心管中, 于 12 000 r/min 条件下离心 (离心半径 12.5 cm) 30 min, 收集滤液。将超滤前、后的样品进样分析, 测定紫草素含量, 计算超滤管回收率。

超滤管回收率 = 超滤后滤液中紫草素质量浓度 / 超滤前溶液中紫草素质量浓度

超滤管回收率考察结果显示, M_w 10 000 规格的超滤管对高、中、低 3 种质量浓度紫草素对照品溶液的平均回收率分别为 (87.59 \pm 0.57)%、(93.94 \pm 2.51)%、(92.75 \pm 0.84)%, M_w 30 000 规格的超滤管的平均回收率分别为 (92.13 \pm 0.31)%、(96.83 \pm 2.44)% 和 (93.04 \pm 1.24)%, 而 M_w 50 000 规格的超滤管对 3 种质量浓度紫草素对照品溶液的平均回收率相对更高, 分别为 (97.63 \pm 0.48)%、(97.75 \pm 1.24)% 和 (94.92 \pm 1.44)%, 因此, 本实验采用 M_w 50 000 规格的超滤管用于后续制剂的包封率测定。

2.3.11 包封率测定 取 Shi-LNPs 混悬液 400 μ L 于超滤离心管 (M_w 50 000) 中, 于 12 000 r/min 条件下离心 (离心半径 12.5 cm) 30 min, 收集滤液测定紫草素含量, 根据色谱峰面积计算游离紫草素质量 ($W_{游}$)。另取 1 mL Shi-LNPs 混悬液, 按“2.3.2”项下方法制备破乳后的样品溶液, HPLC 进样测定紫草素含量, 计算其质量 ($W_{总}$)。平行测定 3 次, 计算 Shi-LNPs 中紫草素的包封率和载药量。同法测定 CS@Shi-LNPs 中紫草素的包封率和载药量。

$$\text{包封率} = (W_{\text{总}} - W_{\text{游}}) / W_{\text{总}}$$

$$\text{载药量} = (W_{\text{总}} - W_{\text{游}}) / (W_{\text{总}} + W_{\text{脂}})$$

$W_{\text{脂}}$ 为制剂中总脂质质量

测定结果显示, 制备的 3 批 Shi-LNPs 中紫草素的包封率为 $(99.78 \pm 0.07)\%$, 载药量为 $(3.48 \pm 0.17)\%$, CS@Shi-LNPs 中紫草素的包封率略有降低, 为 $(99.22 \pm 0.09)\%$, 载药量为 $(1.65 \pm 0.12)\%$ 。

2.4 纳米粒性能表征

2.4.1 整体外观观察

取制备好的 B-LNPs、Shi-LNPs 与 CS@Shi-LNPs 溶液, 于自然光照下观察外观并进行拍摄。由图 3 制剂整体外观图可知, 无载药的 B-LNPs, 本身为泛蓝色乳光的混悬液, 包载紫草素后, 因药物本身的颜色, Shi-LNPs 呈现为紫红色。使用壳聚糖进行修饰后, 由于壳聚糖本身为大分子多糖, 且 Shi-LNPs 与壳聚糖原液的体积比为 1:1, 因此修饰后的混悬液颜色变浅。

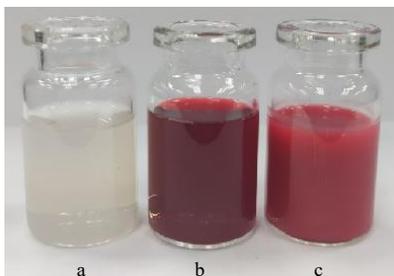


图 3 B-LNPs (a)、Shi-LNPs (b)、CS@Shi-LNPs (c) 的整体外观

Fig. 3 Overall appearance of B-LNPs (a), Shi-LNPs (b), CS@Shi-LNPs (c)

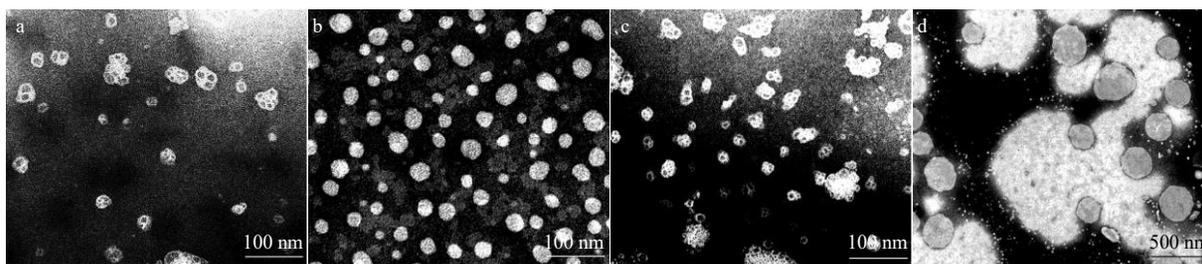


图 5 固-液脂质比 1:4 Shi-LNPs (a)、固-液脂质比 4:1 Shi-LNPs (b)、物理混合物 (c)、CS@Shi-LNPs (d) 的 TEM 图
Fig. 5 TEM images of solid-liquid lipid ratio 1:4 Shi-LNPs (a), solid-liquid lipid ratio 4:1 Shi-LNPs (b), physical mixture (c), CS@Shi-LNPs (d)

Shi-LNPs。此外, 由图 5-d 可知, 修饰后的 CS@Shi-LNPs, 其颗粒与修饰前相比粒径有所增大。

2.4.4 粒径与 ζ 电位测定

平行制备 3 批 Shi-LNPs 和 CS@Shi-LNPs, 取各样品混悬液用蒸馏水稀释至适宜浓度, 使用粒度电位仪分别测定样品的粒径、多分散系数 (polydispersity index, PDI) 和 ζ 电位,

2.4.2 丁达尔效应观察

将 B-LNPs、Shi-LNPs、CS@Shi-LNPs 混悬液用蒸馏水稀释至适宜浓度后, 使用激光笔照射, 观察溶液是否出现丁达尔效应, 结果可见一条明亮的光路 (图 4), 表明溶液中的颗粒粒径在 1~100 nm。

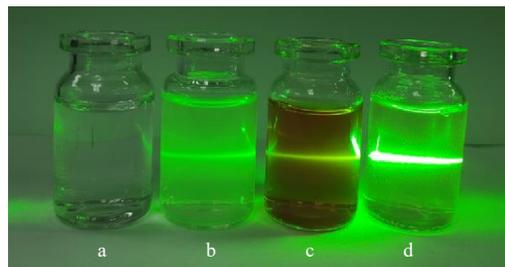


图 4 水 (a)、B-LNPs (b)、Shi-LNPs (c)、CS@Shi-LNPs (d) 的丁达尔效应

Fig. 4 Tyndall effects of water (a), B-LNPs (b), Shi-LNPs (c), CS@Shi-LNPs (d)

2.4.3 微观形貌观察

取适量物理混合物 (紫草素原料药与总脂质混合物)、Shi-LNPs、CS@Shi-LNPs 混悬液, 用蒸馏水稀释至适宜浓度。取稀释后的样品滴于铜网上, 待其自然晾干后, 使用 2% 磷钨酸溶液负染 3 min, 风干后置于 TEM 下观察形态并拍照。TEM 结果显示, 当处方中液态脂质占比较大、固-液脂质比为 1:4 时, 制得的 Shi-LNPs 在 TEM 下呈现为聚集的小液滴, 形状无规则 (图 5-a), 而当固-液脂质比为 4:1 时, 制得的 Shi-LNPs 形状圆整, 粒度较为均一, 分散均匀无黏连 (图 5-b), 因此, 后续实验采用固-液脂质比为 4:1 的处方制备

取平均值。制剂的粒径与 ζ 电位测定结果如表 1 和图 6、7 所示。制得的 3 批 Shi-LNPs 的平均粒径为 (75.0 ± 2.0) nm, PDI 为 0.275 ± 0.044 , 小于 0.3, 表明该体系粒径分布均匀, 具有良好的稳定性。经壳聚糖修饰后, CS@Shi-LNPs 的平均粒径为 (184.7 ± 4.6) nm, 相比修饰前有所增大, 此结果与 TEM 图

表 1 Shi-LNPs 和 CS@Shi-LNPs 的粒径、PDI 和 ζ 电位测定结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Particle size, PDI and ζ potential measurement results of Shi-LNPs and CS@Shi-LNPs ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品	粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV
Shi-LNPs	75.0 \pm 2.0	0.275 \pm 0.044	-33.15 \pm 0.59
CS@Shi-LNPs	184.7 \pm 4.6	0.255 \pm 0.023	5.22 \pm 0.08

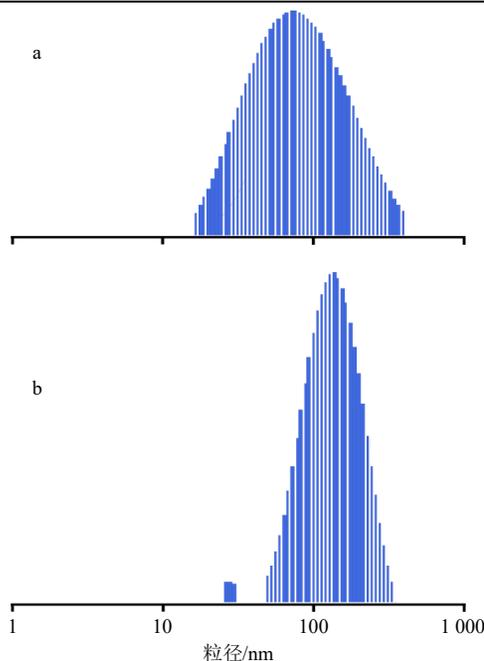


图 6 Shi-LNPs (a) 和 CS@Shi-LNPs (b) 的粒径分布
Fig. 6 Particle size distribution of Shi-LNPs (a) and CS@Shi-LNPs (b)

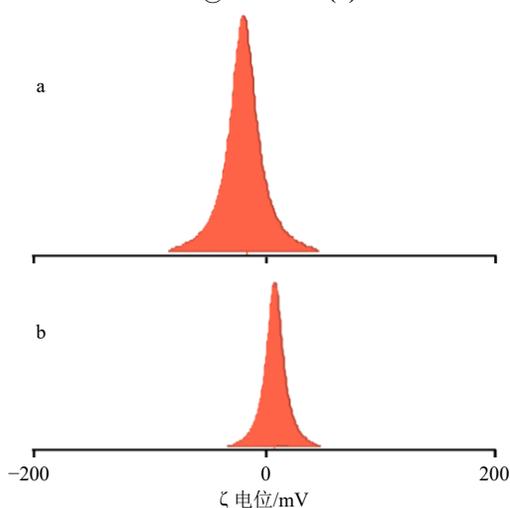


图 7 Shi-LNPs (a) 和 CS@Shi-LNPs (b) 的 ζ 电位分布
Fig. 7 ζ potential distribution of Shi-LNPs (a) and CS@Shi-LNPs (b)

一致。而电荷分布(图 7)结果显示,壳聚糖修饰前 Shi-LNPs 的平均 ζ 电位为 (-33.15 \pm 0.59) mV,修饰后平均 ζ 电位为 (5.22 \pm 0.08) mV,为正电荷。

由于壳聚糖为阳离子修饰材料,因此,该电荷结果可表明壳聚糖成功修饰到 Shi-LNPs 颗粒上,且粒径适宜,PDI 为 0.255 \pm 0.023,小于 0.3,分散性与稳定性良好。

2.4.5 差示扫描量热(differential scanning calorimetry, DSC)测定与 X 射线衍射(X-ray diffraction, XRD)研究 称取紫草素原料药、物理混合物及 B-LNPs、Shi-LNPs、CS@Shi-LNPs 冻干粉各 5 mg,设定测定温度为室温至 400 $^{\circ}$ C,升温速度为 10 $^{\circ}$ C/min,进行 DSC 测定,使用 Origin Pro 软件 2019b 版本绘制 DSC 曲线。另取上述样品,设定扫描范围为 5 $^{\circ}$ ~50 $^{\circ}$,扫描速度为 5 $^{\circ}$ /min,进行 XRD 测定。

样品冻干粉的制备流程为取样品混悬液加入蔗糖(30 mg/mL)作为冻干保护剂,随后置于-20 $^{\circ}$ C 冰箱中预冷冻 12 h,取出后迅速置于真空冷冻干燥机中,冷冻干燥 24 h,即得样品冻干粉。

DSC 结果(图 8)显示,紫草素原料药在 147 $^{\circ}$ C 附近有熔化过程中的吸热峰,在 207 $^{\circ}$ C 左右存在结晶时的放热峰,而 B-LNPs、Shi-LNPs 与 CS@Shi-LNPs 冻干粉在 189 $^{\circ}$ C 左右与 227 $^{\circ}$ C 附近只有脂质熔化的吸热峰。

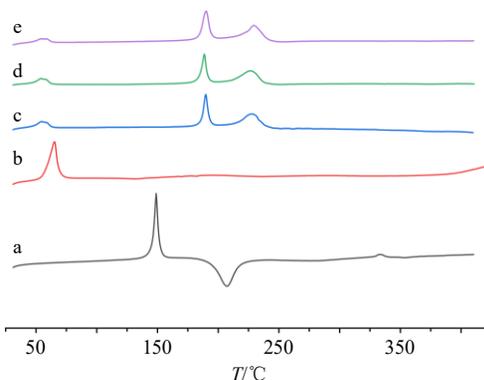


图 8 紫草素原料药 (a)、物理混合物 (b)、B-LNPs (c)、Shi-LNPs (d)、CS@Shi-LNPs (e) 的 DSC 结果
Fig. 8 DSC results of shikonin API (a), physical mixture (b), B-LNPs (c), Shi-LNPs (d), CS@Shi-LNPs (e)

此外,XRD 结果(图 9)显示,紫草素的特征吸收峰在二倍角(2θ)为 8.226 $^{\circ}$ 、10.047 $^{\circ}$ 、10.932 $^{\circ}$ 、14.730 $^{\circ}$ 、21.131 $^{\circ}$ 、22.275 $^{\circ}$ 、25.345 $^{\circ}$ 、26.646 $^{\circ}$ 、29.248 $^{\circ}$ 等位置,而制备成 LNPs 后,这些特征吸收峰均明显减弱,且载药 LNPs 与 B-LNPs 衍射情况相似。

以上结果表明,紫草素被包裹至脂质中形成 LNPs,呈无定形状态,载药 LNPs 制备成功。

2.5 纳米粒透皮性能研究

2.5.1 体外释药行为考察 本实验分别采用动态透

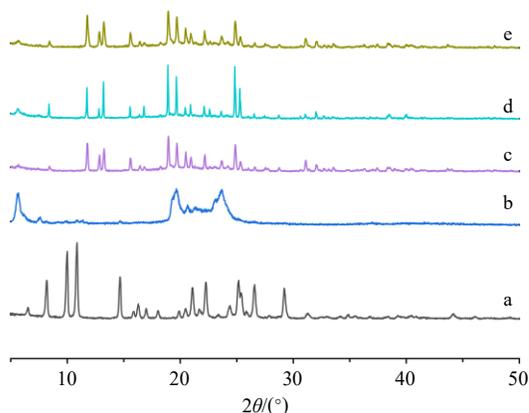


图 9 紫草素原料药 (a)、物理混合物 (b)、B-LNPs (c)、Shi-LNPs (d)、CS@Shi-LNPs (e) 的 XRD 结果
Fig. 9 XRD results of shikonin API (a), physical mixture (b), B-LNPs (c), Shi-LNPs (d), CS@Shi-LNPs (e)

析法与仿生膜法，考察 Shi-LNPs 和 CS@Shi-LNPs 的体外释药行为。紫草素是脂溶性药物，为增加其溶解度，因此，选择 30%乙醇生理盐水为释放介质 (pH 6.73)。

(1) 动态透析法：剪取适宜长度的透析袋（宽度 44 mm， M_w 8 000~14 000），置于蒸馏水中煮沸 20 min 活化，备用。烧杯中加入 150 mL 释放介质，置于 37 °C 水浴中。精密吸取 2 mL Shi-LNPs 混悬液置于处理好的透析袋中，两端扎紧，放入释放介质中，200 r/min 条件下恒速搅拌，分别于加样后 0.5、1.0、2.0、3.0、5.0、7.0、12.0、24.0、30.0 h 吸取 1 mL 释放溶液，作为样品液，同时补充同温等量释放介质。样品液过 0.22 μm 微孔滤膜，按“2.3.3”项下色谱条件测定其紫草素含量。同法测定 CS@Shi-LNPs 的体外释药行为，每组平行测定 3 次。

(2) 仿生膜法：实验前将 Logan Permeafilm 仿生膜（直径 25 mm）浸泡在释放介质中活化 20 min，随后取出，将其固定于 Franz 扩散池中，接收池中加入释放介质，供给池中加入 0.5 mL Shi-LNPs 混悬液，在 (37.0±0.5) °C、200 r/min 条件下恒速搅拌，分别于加样后 0.5、1.0、2.0、3.0、5.0、7.0、12.0、24.0、30.0 h 吸取 1 mL 释放溶液，作为样品液，同时补充同温等量释放介质，HPLC 法测定样品液中紫草素含量。同法测定 CS@Shi-LNPs 的体外释药行为，每组平行测定 3 次。

(3) 体外释药结果：每组所得数据，计算累积释放率 (cumulative release rate, Q_r) 并绘制释放曲线。使用 Origin Pro 2019b 软件对曲线进行模型拟合，根据 R^2 值选择最优拟合模型，探究释药规律。

$$Q_r = (C_n V + \sum_{i=1}^{n-1} C_i V_i) / W$$

C_n 为第 n 个时间点所取样品液中紫草素质量浓度， C_i 为第 i ($i=n-1$) 个时间点所取样品液中紫草素质量浓度， V 为释放介质体积， V_i 为第 i 次所取释放溶液的体积 (1 mL)， W 为加入样品中紫草素总量

Shi-LNPs 与 CS@Shi-LNPs 的体外释药曲线见图 10。由释药曲线可知，Shi-LNPs 和 CS@Shi-LNPs 均可缓慢释药，且动态透析法和 Permeafilm 仿生膜法考察结果均显示，CS@Shi-LNPs 的累积释放率高于 Shi-LNPs。对释药曲线分别进行零级方程、一级方程、Higuchi 方程和 Ritger Peppas 方程模型拟合，结果见表 2。动态透析法考察的释药行为结果中，CS@Shi-LNPs 的 30 h 累积释放率为 (62.39±9.08) %，Shi-LNPs 为 (34.19±2.76) %，两者释药行为方程拟合结果中， R^2 值最高的为一级动力学模型，与零级方程和 Higuchi 方程也具有较高的拟合度 ($R^2 > 0.95$)。而采用仿生膜法考察的释药行为结果显示，CS@Shi-LNPs 的 30 h 累积释放率为 (56.92±1.97) %，Shi-LNPs 为 (34.51±0.35) %，其释药曲线与零级方程拟合度最高，与一级方程也具有较高的拟合度。以上结果均表明，制备的 CS@Shi-LNPs 具有缓控释制剂释放特性。

2.5.2 体外透皮实验 使用异氟烷吸入方式麻醉 SD 大鼠，腹部脱毛，随后处死，取其腹部皮肤，除

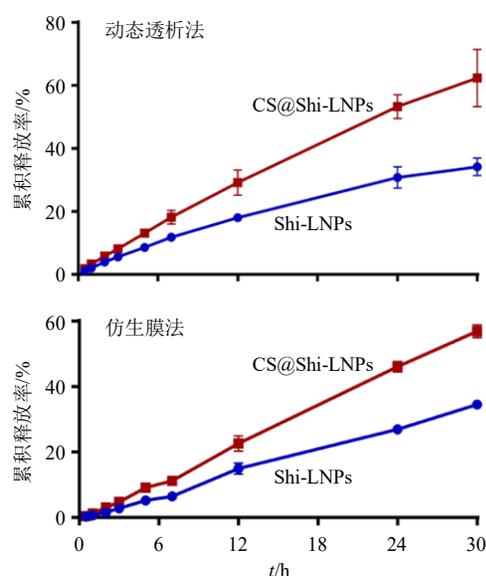


图 10 Shi-LNPs 和 CS@Shi-LNPs 体外释药曲线 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 10 *In vitro* drug release curves of Shi-LNPs and CS@Shi-LNPs ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

表 2 Shi-LNPs 和 CS@Shi-LNPs 体外释药曲线模型拟合结果 (n = 3)

Table 2 Model fitting of *in vitro* drug release profiles for Shi-LNPs and CS@Shi-LNPs (n = 3)

组别	动态透析法			
	零级方程	一级方程	Higuchi 方程	Ritger Peppas 方程
Shi-LNPs	$Q=1.14 t+2.19, R^2=0.9846$	$Q=51.28(1-e^{-0.04t}), R^2=0.9993$	$Q=7.25 t^{1/2}-6.09, R^2=0.9875$	$Q=2.5675 t^{0.77}, R^2=0.9966$
CS@Shi-LNPs	$Q=2.08 t+2.18, R^2=0.9954$	$Q=138.29(1-e^{-0.02t}), R^2=0.9997$	$Q=13.06 t^{1/2}-12.51, R^2=0.9733$	$Q=0.9784 t^{1.06}, R^2=0.9989$
组别	仿生膜法			
	零级方程	一级方程	Higuchi 方程	Ritger Peppas 方程
Shi-LNPs	$Q=1.17 t-0.60, R^2=0.9963$	$Q=-272.88(1-e^{0.01t}), R^2=0.9951$	$Q=7.25 t^{1/2}-8.63, R^2=0.9489$	$Q=0.9799 t^{1.05}, R^2=0.9956$
CS@Shi-LNPs	$Q=1.94 t-0.93, R^2=0.9991$	$Q=-322.11(1-e^{0.01t}), R^2=0.9984$	$Q=12.01 t^{1/2}-14.19, R^2=0.9472$	$Q=1.5812 t^{1.06}, R^2=0.9989$

净内部脂肪与皮下组织，裁剪出适宜大小，用生理盐水充分洗净。将处理好的皮肤固定于 Franz 扩散池中，角质层面向供给池，接收池中加入 30%乙醇生理盐水作为接收介质，排除皮肤与接收池溶液之间的气泡。向各组供给池中加入 0.5 mL 样品 [紫草素乙醇溶液（精密称取紫草素 10.0 mg 置于 10 mL 量瓶中，加乙醇溶解、定容至刻度，得 1.00 mg/mL 紫草素乙醇溶液）、Shi-LNPs 和 CS@Shi-LNPs，每个样品紫草素加入量均为 0.5 mg]，在 (37.0 ± 0.5) °C、350 r/min 条件下恒速搅拌。分别于加样后 0.5、1.0、2.0、4.0、6.0、9.0、12.0、24.0、30.0 h 吸取 1 mL 接收池溶液，作为样品液，同时补充同温等量接收介质。

将各时间点所取样品液过 0.22 μm 微孔滤膜，按“2.3.3”项下 HPLC 法测定紫草素含量，分别计算单位面积累积渗透量 (cumulative permeation quantity, Q_n) 和经皮渗透速率 (J_s)，绘制 Q_n-t 曲线。使用 Origin Pro 2019b 软件对该曲线进行模型拟合，根据 R^2 值选择最优拟合模型。

$$Q_n = (C_n V + \sum_{i=1}^{n-1} C_i V_i) / A$$

$$J_s = dQ_n / dt$$

C_n 为第 n 个时间点所取接收液中紫草素质量浓度， C_i 为第 i 个时间点所取接收液中紫草素质量浓度， V 为接收池液体体积 (15 mL)， V_i 为第 i 次所取样品的体积 (1 mL)， A 为渗透屏障面积 (1.766 cm²)， J_s 为透皮曲线线性回归方程斜率

2.5.3 真皮滞留量 (Q_s) 透皮实验结束后，取下离体皮肤，用生理盐水冲洗去除残留药物，滤纸吸干水分，剥离角质层，将皮肤剪碎后加适量生理盐水研磨成浆，所得匀浆液加入 1 mL 甲醇，超声 5 min，3 500 r/min 离心 (离心半径 12.5 cm) 10 min，取上清液过 0.22 μm 微孔滤膜，HPLC 法测定紫草素在各组皮肤真皮中的滞留量，计算药物 Q_s 。

$$Q_s = C_s V_s / A$$

C_s 为真皮样品中紫草素含量， V_s 为真皮样品液体积， A 为渗透屏障面积 (1.766 cm²)

2.5.4 体外透皮研究及 Q_s 测定结果 体外透皮实验中各组药物 Q_n-t 曲线见图 11。结果显示，在透皮 5 h 后，Shi-LNPs 和 CS@Shi-LNPs 组的 Q_n 值均明显高于紫草素乙醇溶液组；并且 CS@Shi-LNPs 的 Q_n 值在透皮 12 h 后逐渐高于 Shi-LNPs；透皮 30 h 后，CS@Shi-LNPs 的 Q_n 值为 (14.27 ± 1.58) μg/cm²，相比 Shi-LNPs 提高了约 0.24 倍。表明制备成 LNPs 可显著提高紫草素的经皮渗透性能，且经过壳聚糖修饰后，由于壳聚糖的黏附性与较高的生物相容性，药物的 Q_n 也获得提高。

对 Q_n-t 曲线进行模型拟合，结果见表 3，各组中药物的皮肤 Q_s 与 J_s 见表 4。除紫草素乙醇溶液外，其余各组药物经皮释放曲线与零级方程、一级方程和 Ritger Peppas 方程，均具有较高的拟合度 ($R^2 > 0.95$)，表明负载紫草素的 LNPs 能在皮肤中缓慢且恒定释药。

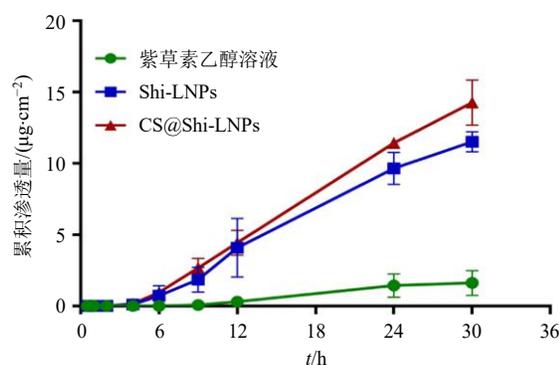


图 11 紫草素乙醇溶液、Shi-LNPs 和 CS@Shi-LNPs 的经皮累积渗透量曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 11 Transdermal cumulative permeation curves of shikonin ethanol solution, Shi-LNPs and CS@Shi-LNPs ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

表 3 紫草素乙醇溶液、Shi-LNPs 和 CS@Shi-LNPs 的经皮累积渗透量曲线模型拟合 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Model fitting of cumulative transdermal permeation curves for Shi ethanol solution, Shi-LNPs and CS@Shi-LNPs ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	零级方程	一级方程	Higuchi 方程	Ritger Peppas 方程
紫草素乙醇溶液	$Q=0.060 t-0.180,$ $R^2=0.969 9$	-	$Q=0.360 t^{1/2}-0.560,$ $R^2=0.822 5$	$Q=0.006 2 t^{1.660},$ $R^2=0.945 3$
Shi-LNPs	$Q=0.400 t-0.760,$ $R^2=0.993 2$	$Q=-9.650 (1-e^{-0.030 t}),$ $R^2=0.987 5$	$Q=2.470 t^{1/2}-3.450,$ $R^2=0.918 3$	$Q=0.149 0 t^{1.280},$ $R^2=0.993 2$
CS@Shi-LNPs	$Q=0.500 t-0.960,$ $R^2=0.991 4$	$Q=-11.100 (1-e^{-5.210 t}),$ $R^2=0.987 7$	$Q=3.080 t^{1/2}-4.310,$ $R^2=0.913 2$	$Q=0.175 2 t^{1.300},$ $R^2=0.993 3$

表 4 紫草素乙醇溶液、Shi-LNPs 和 CS@Shi-LNPs 的体外透皮实验相关参数

Table 4 Parameters related to *in vitro* transdermal assay of Shi ethanol solution, Shi-LNPs and CS@Shi-LNPs

组别	$Q_n/(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2})$	$J_s/(\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{cm}^{-2})$	拟合方程
紫草素乙醇溶液	1.45 ± 0.16	0.06 ± 0.01	$Q=0.060 0 t-0.18, R^2=0.969 9$
Shi-LNPs	3.08 ± 0.05	0.45 ± 0.03	$Q=0.149 0 t^{1.28}, R^2=0.993 2$
CS@Shi-LNPs	2.74 ± 0.10	0.50 ± 0.02	$Q=0.175 2 t^{1.30}, R^2=0.993 3$

3 讨论

银屑病是一种常见的慢性炎症性皮肤病，需要长期用药管理。TDDS 是避免长期用药导致不良反应的可行性措施。脂质包封的纳米颗粒可能是提高局部应用紫草素的透皮性能和延长药物在病变区域作用时间的有效途径。皮肤是人体的第一道保护屏障，皮肤在保护身体免受病原体的侵害的同时也阻碍了药物的透皮渗透。过去十几年，人们已经采取了许多方法克服皮肤的渗透屏障，包括使用化学促渗剂或采用离子渗透、电穿孔等方法^[12]。但此类方法存在递送效率不理想、设备成本高、治疗过程痛苦和侵入性等问题。脂质纳米系统在透皮给药中可以通过破坏脂质层促进皮肤渗透、增强装载药物的稳定性、减少不良反应以及实现精确靶向作用^[13]。课题组前期已成功制备丹酚酸 B 脂质体、双丹脂质体等多种类型载药脂质体，并使用体外透皮实验、经皮微透析技术成功验证了脂质纳米系统能有效延缓药物释放速率，同时提高药物经皮渗透能力^[14-15]。本次体外释药行为与透皮实验结果显示，脂质纳米粒能有效解决紫草素透皮性能差的问题，同时 CS@Shi-LNPs 具备缓释作用，且 Q_n 高于 Shi-LNPs。

在本研究中同时使用动态透析法和仿生膜法考察体外释药行为。Permeafilm 是一种生物仿生膜，其主要成分为磷脂和再生纤维素，可模仿人类皮肤的重要结构和化学特征。本实验中，仿生膜法与动态透析法所得体外释药曲线相近，而使用仿生膜法考察所得数据误差值较小，表明 Permeafilm 用于考

察药物的释放行为具有一定的参考价值，相比动态透析法，其重复性更佳。本实验使用 Franz 扩散池法考察体外透皮能力。制备的负载紫草素的脂质纳米粒的经皮释放行为符合零级方程、一级方程以及 Ritger Peppas 方程 ($R^2 > 0.95$)，Shi-LNPs 和 CS@Shi-LNPs 的 Q_n 曲线拟合度最高的模型均为 Ritger Peppas 方程，表明药物在皮肤中的扩散为溶蚀过程，符合脂质纳米粒的缓释释放特性。

壳聚糖是天然阳离子多糖，具有低细胞毒性、良好的生物相容性与可降解性等特性。因其抗菌活性和对带负电荷的表面（如皮肤和黏膜）具有较好的生物黏附性，是纳米颗粒制剂常用的表面修饰材料^[16]。为了增强脂质纳米粒的外用效果，提高药物对皮肤表面的黏附性，故本实验以壳聚糖为修饰材料，采用静电吸附法对制得的 Shi-LNPs 进行表面修饰，最终制得的 CS@Shi-LNPs 具备缓释作用，且 Q_n 高于紫草素乙醇溶液和 Shi-LNPs。这是因为壳聚糖属于阳离子修饰材料，制得的 CS@Shi-LNPs 为正电荷粒子，而皮肤表面通常带负电荷，因此，壳聚糖修饰增大了颗粒对皮肤的黏附性，使药物具备缓释作用，有利于皮肤局部疾病的治疗^[17]。并且，壳聚糖可增大角质层细胞通透性，使药物的经皮渗透性能提高，从而获得更高的 Q_n ，使皮肤内部的药物储库不断释放药物，发挥局部长效作用^[18]。

本研究采用高速搅拌超声法制备了 Shi-LNPs，并通过静电吸附法对其进行壳聚糖表面修饰。Shi-LNPs 的制备方法简单，纳米粒外形圆整、粒径适

宜、颗粒分布均匀,具备缓控释药特性以及良好的经皮渗透性,可以提高患者顺应性和依从性。后续实验将从细胞水平以及动物层面去深入研究 Shi-LNPs 治疗银屑病的效果及作用机制,为紫草素治疗银屑病研究提供科学依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 355-356.
- [2] 张文静, 李萍, 王燕, 等. 紫草治疗银屑病临床和实验研究进展 [J]. 中国中医药信息杂志, 2020, 27(8): 141-144.
- [3] 钱雪, 李海涛, 曾万祥, 等. 紫草化学成分、药理作用及产品应用研究进展 [J]. 中国野生植物资源, 2021, 40(3): 52-56.
- [4] Yu Y J, Xu Y Y, Lan X O, *et al.* Shikonin induces apoptosis and suppresses growth in keratinocytes via CEBP- δ upregulation [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 72: 511-521.
- [5] 郭译濛, 周明明, 郭晋荣, 等. 紫草素通过 p38 MAPK 信号通路改善咪喹莫特诱导的小鼠银屑病样皮肤炎症反应 [J]. 中国免疫学杂志, 2022, 38(6): 676-680.
- [6] Guo Y M, Zhou M M, Mu Z Z, *et al.* Recent advances in shikonin for the treatment of immune-related diseases: Anti-inflammatory and immunomodulatory mechanisms [J]. *Biomedicine Pharmacother*, 2023, 165: 115138.
- [7] 姚新宇, 赵琨, 王明悦, 等. 银屑病外用药物发展历程与启示 [J]. 中国医学前沿杂志: 电子版, 2021, 13(12): 19-24.
- [8] Lee H J, Kim M. Challenges and future trends in the treatment of psoriasis [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(17): 13313.
- [9] Phatale V, Vaiphei K K, Jha S, *et al.* Overcoming skin barriers through advanced transdermal drug delivery approaches [J]. *J Control Release*, 2022, 351: 361-380.
- [10] Liu L J, Zhao W B, Ma Q M, *et al.* Functional nano-systems for transdermal drug delivery and skin therapy [J]. *Nanoscale Adv*, 2023, 5(6): 1527-1558.
- [11] Akombaetwa N, Ilangala A B, Thom L, *et al.* Current advances in lipid nanosystems intended for topical and transdermal drug delivery applications [J]. *Pharmaceutics*, 2023, 15(2): 656.
- [12] Giri T K, Chakrabarty S, Ghosh B. Transdermal reverse iontophoresis: A novel technique for therapeutic drug monitoring [J]. *J Control Release*, 2017, 246: 30-38.
- [13] Qu F, Geng R, Liu Y J, *et al.* Advanced nanocarrier- and microneedle-based transdermal drug delivery strategies for skin diseases treatment [J]. *Theranostics*, 2022, 12(7): 3372-3406.
- [14] Shi J, Guo S Y, Wu Y T, *et al.* Behaviour of cell penetrating peptide TAT-modified liposomes loaded with salvianolic acid B on the migration, proliferation, and survival of human skin fibroblasts [J]. *J Liposome Res*, 2020, 30(1): 93-106.
- [15] 赖建辉, 张小灵, 时军, 等. 基于微透析技术的双丹脂质体凝胶大鼠皮肤药动学研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2020, 31(3): 336-341.
- [16] Wang J L. Chitosan-based materials: Preparation, modification and application [J]. *J Clean Prod*, 2022, 355(6): 131825.
- [17] Kou S G, Peters L, Mucalo M. Chitosan: A review of molecular structure, bioactivities and interactions with the human body and micro-organisms [J]. *Carbohydr Polym*, 2022, 282: 119132.
- [18] Burki F A, Shah K U, Razaque G, *et al.* Optimization of chitosan-decorated solid lipid nanoparticles for improved flurbiprofen transdermal delivery [J]. *ACS Omega*, 2023, 8(22): 19302-19310.

[责任编辑 郑礼胜]