

水蛭提取物脂质体温敏凝胶制备研究



兆书琪, 吴金浩, 杨思楠, 蒋琪玖, 刘华石

黑龙江省中医药科学院中药研究所 (哈尔滨 150036)

【摘要】目的 优化水蛭提取物脂质体温敏凝胶的制备工艺, 完成制剂基础理化指标考察。**方法** 采用薄膜分散法制备水蛭提取物脂质体, 以脂质体包封率为评价指标, 结合单因素试验与正交试验筛选最优脂质体处方; 测定脂质体粒径、多分散指数及 Zeta 电位, 同步开展脂质体储存稳定性研究。以最优工艺制得的水蛭提取物脂质体为基质, 借助单因素试验与交叉试验优化温敏凝胶成型处方, 并对所得脂质体温敏凝胶开展系统质量评价。**结果** 水蛭提取物脂质体最佳处方为卵磷脂浓度 40%, 卵磷脂与胆固醇质量比 4 : 1, 卵磷脂与药物质量比 15 : 1。脂质体包封率为 67.37%, 载药量为 5.39%, 平均粒径为 (213.68 ± 7.16) nm, 粒度分布为 0.254 ± 0.02 , Zeta 电位为 (-32.05 ± 0.43) mV。水蛭提取物脂质体温敏凝胶最佳处方为 18% 泊洛沙姆 407, 10% 泊洛沙姆 188, 3% 丙二醇, 20% 水蛭提取物脂质体。胶凝温度 (33.1 ± 0.66) °C, 产品为乳白色不透明凝胶, 常温下黏度 (184.7 ± 13.4) mPa·s, 加热至 33.5 °C 黏度为 (513.9 ± 18.6) mPa·s, pH 为 4.63 ± 0.04 。体外透皮实验中, 水蛭提取物脂质体温敏凝胶的稳态渗透速率 (J_{ss}) 为 $46.12 \mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$, 分别是水蛭提取物温敏凝胶的 1.31 倍, 水蛭提取物的 3.68 倍; J_{ss} 及 9 h 累积渗透量比较, 3 组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 脂质体温敏凝胶组显著高于普通凝胶组和原药组。**结论** 水蛭提取物脂质体温敏凝胶的制备工艺简单可行, 易于复制, 在接触皮肤时迅速凝结包覆瘢痕表面, 达到长效给药的效果。

【关键词】 水蛭提取物; 脂质体; 温敏凝胶; 薄膜分散法; 正交试验; 卵磷脂; 胆固醇

【中图分类号】 R944

【文献标识码】 A

Study on the preparation of liposomal thermosensitive gel of leech extract

ZHAO Shuqi, WU Jinhao, YANG Sinan, JIANG Qiwen, LIU Huashi

Institute of Chinese Materia Medica, Heilongjiang Academy of Chinese Medicine Sciences, Harbin 150036, China

Corresponding author: LIU Huashi, Email: 15645633859@163.com

【Abstract】Objective To optimize the preparation process of liposomal thermosensitive gel of leech extract and systematically investigate its basic physicochemical properties. **Method** The hydrophilic extract of leech was encapsulated into liposomes by the thin-film dispersion method. Using encapsulation efficiency as the evaluation index, the optimal liposome formulation was determined through single-factor experiments combined with orthogonal design. The particle size, polydispersity index (PDI), and zeta potential of the optimized liposomes were characterized, and their storage stability was evaluated. The liposomal thermosensitive gel was then formulated with the optimized liposomes as the drug reservoir; its composition was optimized via single-factor

DOI: 10.12173/j.issn.2097-4922.202602007

基金项目: 黑龙江省自然科学基金项目 (LH2022H061)

通信作者: 刘华石, 硕士, 助理研究员, Email: 15645633859@163.com

and cross-over experiments, followed by systematic quality evaluation. **Results** The optimal formulation for leech extract liposomes was determined to be 40% lecithin concentration, a lecithin-to-cholesterol mass ratio of 4:1, and a lecithin-to-drug mass ratio of 15:1. The encapsulation efficiency was 67.37%, drug loading capacity was 5.39%, average particle size was (213.68 ± 7.16) nm, polydispersity index was 0.254 ± 0.02 , and zeta potential was (-32.05 ± 0.43) mV. The optimal formulation for the thermosensitive gel containing leech extract liposomes consisted of 18% P407, 10% P188, 3% propylene glycol, and 20% leech extract liposomes. The gelation temperature was (33.1 ± 0.66) °C, and the product was a milky white opaque gel. At room temperature, the viscosity was (184.7 ± 13.4) mPa·s, and when heated to 33.5 °C, the viscosity was (513.9 ± 18.6) mPa·s, with a pH of 4.63 ± 0.04 . In *in vitro* transdermal experiments, the steady-state flux (J_{ss}) of the liposome thermosensitive gel group was $46.12 \mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$, which was 1.31 times higher than that of the conventional gel group and 3.68 times higher than that of the free drug group. Comparisons of J_{ss} and cumulative permeation amount over 9 hours showed significant differences among the three groups ($P < 0.05$), with the liposome-based thermo-sensitive gel group showing significantly higher values than both the conventional gel and free drug groups. **Conclusion** The preparation process of leech extract liposomal thermosensitive gel is simple and feasible. The gel rapidly gels upon contact with the skin, covering the scar surface and achieving a long-lasting drug delivery effect.

【Keywords】 Leech extract; Liposome; Thermosensitive gel; Film dispersion method; Orthogonal test; Lecithin; Cholesterol

水蛭为黄蛭科动物蚂蟥 (*Whitmania pigra* Whitman)、医蛭科动物水蛭 (*Hirudo nipponica* Whitman) 或黄蛭科动物柳叶蚂蟥 (*Whitmania acranulata* Whitman) 的干燥全体^[1]。其中宽体金线蛭即蚂蟥是我国目前主要饲养的一种非吸血水蛭,也是我国目前临床上使用最多的品种^[2],其药理作用主要有抗凝血^[3-7]、抗炎^[8-9]、抗肿瘤^[10-12]、抗纤维化^[13-15]等。目前已从水蛭中分离出的化合物包括蛋白质、多肽、酶等大分子物质和嘌呤类、糖脂类、羧酸酯类和甾体类等小分子物质,以及锌、锰、铁等元素^[16-18]。蛋白多肽类是水蛭中活性最强、含量最多的一类成分,其中水蛭素为发现最早且研究最深入的成分,是目前已知最强的天然凝血酶抑制剂^[19]。研究表明,采用四甲基偶氮唑蓝 (methyl thiazolyl tetrazolium, MTT) 法检测,发现水蛭含药血清在缺氧条件下,能抑制细胞增殖^[12]。水蛭提取物通常以乳膏剂为主要外用制剂,用于瘢痕修复,由于其多肽类成分易降解且透膜能力差,目前正在寻找新的给药体系。

脂质体是一种由磷脂双分子层构成的纳米级或微米级的囊泡,内部包裹水相核心,是一种极具代表性的纳米给药系统。脂质体的膜结构与细胞膜高度相似,因此具有良好的生物相容性,在

药物递送方面发挥重要作用^[20]。温敏凝胶在常温下为液态溶胶,随着给药后产生的温度变化发生相转变形成非化学交联的半固态凝胶,相变原理为温度改变后其中氢键或疏水作用随之改变,从而导致物理状态发生改变,即环境温度低于最低临界相变温度时呈现液体溶胶状态,高于临界相变温度时呈现半固体凝胶状态。可黏附于表皮随体温转变为半固体凝胶,在给药部位长时间滞留达到稳定匀速给药的目的^[21]。

本研究从水蛭饮片中提取分离总蛋白,采用薄膜分散法对水蛭提取物进行包合,制备新型柔性纳米脂质体溶液,以正交试验优化脂质体制备工艺,通过粒径、粒度分布、Zeta 电位测定和稳定性实验进行脂质体质量评价。在此基础上,进一步采用单因素试验筛选主要影响因素,交叉试验优化水蛭提取物脂质体温敏凝胶制备工艺,并考察其质量。现报道如下。

1 材料与试剂

1.1 主要仪器

ZNCL-DLS 磁力搅拌器 (巩义市予华仪器有限公司); CP-4000 旋转流变仪 (上海三踏生物有限公司); BSA224S-CW 电子天平 (北京赛多利斯科学仪器有限公司); SORVALLST16R 冷

冻离心机（德国赛默飞世尔科技公司）；N-1300 旋蒸仪（上海爱朗仪器有限公司）；LC-JY96 细胞破碎仪（湖南力辰仪器科技有限公司）；BeNano 180Zeta 纳米粒度电位分析仪（丹东百特仪器有限公司）；AF-10A500g 中药粉碎机（温岭市奥力中药机械有限公司）；ADEX-1002-M 艾科浦超纯水机（重庆颐洋企业发展有限公司）；KQ-800KDB 高功率数控超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；TG16WS 台式高速离心机（湖南赛特湘仪离心机仪器有限公司）；LC-20A 高效液相色谱仪（日本岛津公司）；371 二氧化碳细胞培养箱（德国赛默飞世尔科技公司），M200 多功能酶标仪（奥地利TECAN公司）。

1.2 主要药品与试剂

水蛭饮片（产地：安徽，批号：250301）购自北京同仁堂香坊店，经黑龙江省中医药科学院中药研究所霍金海研究员鉴定为黄蛭科动物蚂蟥的干燥全体，符合《中国药典》2025 年版水蛭项下的相关规定^[1]；水蛭素对照品（成都植标化纯生物技术有限公司，批号：CP-20260129001，纯度 98%）；乙腈（德国默克股份两合公司，批号：11351530427，纯度 $\leq 100\%$ ）；Thri-hcl 缓冲液（批号：R21105）、磷酸盐缓冲液（phosphate buffered saline, PBS，批号：R22692）、氯化钠（批号：S111533）购自上海源叶生物科技有限公司；聚氰基丙烯酸正丁酯（bicinchoninic acid, BCA）蛋白浓度测定试剂盒（批号：P0010）、细胞冻存管（批号：FCV026-1bag）、81 孔液氮罐专用冻存盒（批号：FBX081）购自上海碧云天生物技术有限公司；MTT 试剂盒（批号：M1020）、蛋黄卵磷脂（批号：L8260）、胆固醇（批号：C8280）、泊洛沙姆 188（批号：H2409941）、泊洛沙姆 407（批号：H2409858）购自北京索莱宝科技有限公司；人增生性瘢痕成纤维细胞（hypertrophic scar fibroblast, HSFb，批号：SNP-H341）、HSFb 完全培养基（批号：SNPM-H341）购自武汉尚恩生物技术有限公司；无血清非程序冻存液（武汉普诺赛生命科技有限公司，批号：PB180438）；无水乙醇（西陇科学股份有限公司，批号：B2207041）；丙二醇（哈尔滨三联药业股份有限公司，批号：230414D06）；二甲苯（天津市富宇精细化工有限公司，批号：20190505）；超纯水为实验室自制。

1.3 动物

SPF 级 SD 大鼠共 10 只，雌雄各半，体重 180 ~ 220 g，购自哈尔滨医科大学动物实验中心，许可证号：SYXK（黑）2024-014，饲养温度 20 ~ 26℃，湿度 40% ~ 60%，12/12h 明暗周期，饲养室保持安静。按性别分笼饲养于黑龙江省中医药科学院中药研究所动物房，自由采食，每周更换两次垫料。本实验经黑龙江省中医药科学院实验动物伦理委员会批准（批准号：SY3R-2026049）。

2 方法与结果

2.1 水蛭提取物的制备与含量测定

2.1.1 水蛭提取物的制备

根据前期研究^[22]和预试验结果，确定水蛭提取物提取分离方法。

（1）水蛭提取：水蛭饮片粉碎后过三号筛制得水蛭粗粉，于 4℃ 条件下浸泡于 10 倍量 0.9% 氯化钠溶液中 12 h，20℃ 超声震荡（功率：100 W，频率：20 kHz）2 h，每隔 10 min 搅拌 1 次，超声处理后将溶液抽滤得到水蛭粗提溶液，于 4℃ 离心（ $5724 \times g$ ）15 min，取上清液分装于 1 000 Da 的透析袋中，透析脱盐 2 d，透析后溶液先旋蒸至 100 mL，再冷冻干燥，冻干粉在 -80℃ 冰箱中保存。

（2）提取物分离：DEAE-琼脂糖凝胶 FF 的保存液为 20% 乙醇，将其倒出后用纯水冲洗除去乙醇，除去气泡后装柱。取 1.6 cm $\times$ 20 cm 的层析柱 1 根，纯水清洗，将层析柱垂直固定于铁架台上，连接器材并固定，排出气泡检查气密性。先注入柱体积 1/3 的 20% 乙醇溶液作为缓冲层。在玻璃棒搅拌下，将 DEAE-琼脂糖凝胶 FF 介质悬液沿柱壁缓慢导入柱中，静置待介质初步沉降。沉积层达 1 ~ 2 cm 时，开启柱底出水口并同步匀速补加介质悬液，至距柱顶 5 cm 处停止。关闭出水口至介质完全沉降后，以 2 mL/min 恒定流速排出柱内液体直至柱床稳定，最终测得柱体积为 20 mL。用 0.02 mol/L 的 Tris-HCl 平衡缓冲液缓慢匀速冲过柱子，测量流出液的 pH 值，当流出液的 pH 值与初始缓冲溶液一致且不再变化时达到完全平衡，共约冲洗 5 倍柱体积。取 3.8g 水蛭冻干粉加入到 400 mL 0.02 mol/L 的 Tris-HCl 平衡缓冲液中搅拌均匀，每次上样量 200 mL，用流动相为 0.3 mol/L NaCl 缓冲液洗脱，BCA 法测定每次洗脱后蛋白浓度，与初始缓冲液一致时停止洗脱，转

移至截留分子量 1 000 Da 的透析袋中除盐 24 h。冷冻干燥,放入干燥皿中保存备用。BCA 法测得水蛭饮片中总蛋白含量为 3.5 mg/mL。

2.1.2 水蛭提取物含量测定

采用 HPLC 法检测水蛭提取物中水蛭素的含量。色谱条件: Waters Acquity BEH C₁₈ 色谱柱 (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm); 流动相: 超纯水 (A)-乙腈 (B), 梯度洗脱 (0~40 min, 5%→60% B); 流速为 0.8 mL/min; 检测波长为 205 nm; 柱温为 35 °C; 进样量为 20 μL^[23]。对照品溶液的制备: 精密称取水蛭素对照品 10.01 mg, 置于 10 mL 容量瓶中, 加入甲醇充分溶解后定容至刻度线。供试品溶液的制备: 精密称取水蛭提取物脂质体混悬液 1.0 g 置于锥形瓶中加入 25 mL 冰无水乙醇摇匀, -20 °C 静置 10 min 后, 4 °C 离心 (20 124 × g) 10 min, 弃上清液, 挥干乙醇后加入 10 mL 甲醇溶解沉淀, 振荡混匀。阴性样品溶液: 精密称取空白脂质体混悬液 1.0 g, 制备方法同供试品溶液制备。色谱图见图 1。

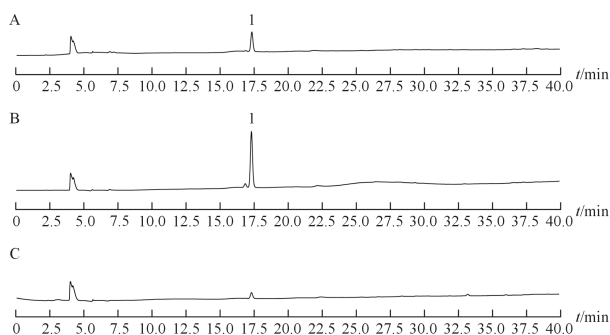


图 1 水蛭提取物溶液 HPLC 色谱图

Figure 1. HPLC chart of leech extract solution

注: A. 对照品溶液; B. 供试品溶液; C. 阴性样品溶液; 1. 水蛭素。

精确称取水蛭素标准品 25.01 mg, 置于 10 mL 容量瓶中, 加入甲醇充分溶解后定容至刻度线, 即得水蛭素标准品储备液。精确移取水蛭素标准品储备液 0.1、0.2、0.4、0.8、1.0 mL, 分别置于 5 mL 量瓶中定容, 制得浓度依次为 0.199 9、0.399 8、0.799 7、1.599 4、1.999 2 mg/mL 的标准品系列溶液, 同时将浓度为 2.501 mg/mL 的标准品储备溶液直接作为最高浓度标准品溶液。取各标准品溶液 20 μL, 分别注入液相色谱仪测定峰面积。建立水蛭素浓度 (X , mg/mL) 与峰面积 (Y) 的回归方程为 $Y = 62\,712.177X + 108\,666.399$, $R^2 = 0.997\,5$, 表明在 0.200 ~ 2.501 mg/mL 的浓度范围内线性关系良好。精密度考察结果: RSD 为

0.89% ($n=6$); 重复性考察结果: 样品平均含量为 1.79 mg/mL, RSD 为 1.06% ($n=6$); 24 h 稳定性考察结果: RSD 为 1.68% ($n=6$); 回收率试验结果: 平均加样回收率为 98.95%, RSD 为 1.17% ($n=6$)。以上结果表明, 本方法的精密度、重复性、稳定性和准确度均良好。

含量测定结果: 水蛭提取物中水蛭素含量为 1.80 mg/mL。

2.2 统计学分析

采用 SPSS26.0 软件对试验结果进行统计学分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用独立样本 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 方差齐时采用 LSD- t 检验进行组间两两比较, 方差不齐时采用校正方差分析, 并进行事后多重比较, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2.3 水蛭提取物脂质体的制备工艺优化

2.3.1 水蛭脂质体制备

精密称取处方量卵磷脂、胆固醇、水蛭提取物冻干粉、无水乙醇置于烧杯中, 并于磁力搅拌器 30 °C 预热, 搅拌至溶解; 溶解后加入旋转蒸发器中, 35 °C 旋转蒸发至乙醇完全挥发, 形成均匀薄膜; 再加入 20 mL PBS 溶液旋转蒸发至脂质薄膜完全溶解, 浓缩制得 10 mL 混悬液, 在细胞破碎仪中冰浴超声 5 min 后在 4 °C 冰箱中静置, 冻干保存于 -80 °C 冰箱中。

2.3.2 脂质体包封率及载药量的测定

为排除脂质成分对蛋白质定量的干扰, 本试验改进既往研究^[24]的乙醇沉淀法, 采用 BCA 法和间接法测定包封率。取解冻后的 100 μL 脂质体样品, 4 °C 离心 (89.44 × g) 10 min, 弃上清液, 加入 100 μL 纯水溶解沉淀, 涡旋振荡混匀后测定蛋白含量, 记为游离蛋白 (W_{free})。另取 100 μL 脂质体样品, 加入 1 mL 冰无水乙醇破膜沉淀蛋白, -20 °C 静置 10 min 后, 4 °C 离心 (20 124 × g) 10 min, 弃上清液, 干燥去除痕量乙醇, 加入 100 μL 超纯水溶解沉淀, 涡旋振荡混匀后测定蛋白含量, 记为总蛋白 (W_{total})。按以下公式计算包封率 (EE) 和载药量。

$$EE (\%) = (W_{\text{total}} - W_{\text{free}}) / W_{\text{total}} \times 100\%$$

$$\text{载药量} = EE \times m_{\text{投}} / m_{\text{总}}$$

式中, EE 为包封率, $m_{\text{投}}$ 为样品总投药量, $m_{\text{总}}$ 为样品总质量。

2.3.3 单因素试验

(1) 卵磷脂浓度：取 120 mg 卵磷脂和 15 mL 无水乙醇，固定投药量为 4 mg，以 20%、30%、40%、50%、60% 的卵磷脂浓度制备脂质体，重复 3 次，计算平均包封率。卵磷脂浓度对包封率的影响如图 2-A 所示，卵磷脂浓度为 40% 时，包封率达到最大值 61.24%。

(2) 卵磷脂与胆固醇质量比：取 120 mg 卵磷脂和 15 mL 无水乙醇，固定投药量为 4 mg，以 2 : 1、3 : 1、4 : 1、5 : 1、6 : 1 的卵磷脂与胆固醇之比制备脂质体，重复 3 次，计算平均包封率。卵磷脂与胆固醇质量比对包封率的影响如图 2-B 所示，卵磷脂与胆固醇质量比为 4 : 1 时，包封率达到最大值 60.72%。

(3) 卵磷脂与药物质量比：取 120 mg 卵磷脂和 15 mL 无水乙醇，固定 PBS 溶液量为 4 mL，以 5 : 1、10 : 1、15 : 1、20 : 1、25 : 1 的卵磷脂与药物质量比制备脂质体，重复 3 次，计算平均包封率。卵磷脂与药物质量比对包封率的影响如图 2-C 所示，卵磷脂与药物质量比为 15 : 1 时，包封率达到最高值 63.62%。

2.3.4 正交试验

根据单因素试验结果，选取卵磷脂浓度 (A)、卵磷脂与胆固醇质量比 (B)、卵磷脂与药物质量比 (C) 3 个因素，每个因素中选择 3 个水平进行正交试验，对水蛭提取物质脂质体制备工艺进行优化。因素水平见表 1，正交试验结果见表 2，方差分析见表 3。

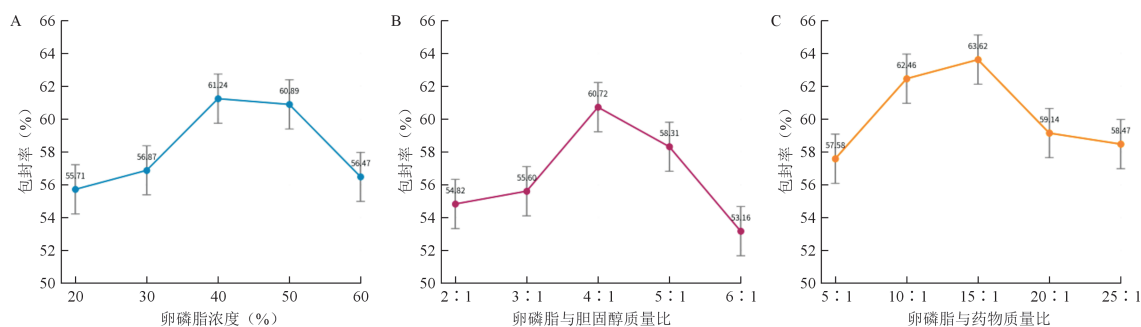


图2 卵磷脂浓度与胆固醇及药物质量比对包封率的影响 ($n = 3$)

Figure 2. Effect of phospholipid concentration and the ratio of cholesterol to drug mass on encapsulation efficiency ($n = 3$)

注：A. 卵磷脂浓度；B. 卵磷脂与胆固醇质量比；C. 卵磷脂与药物质量比。

表 1 水蛭提取物脂质体正交试验因素水平表

Table 1. Orthogonal experiment factor levels of liposomes from leech extract

水平	因素		
	A (%)	B	C
1	30	3 : 1	10 : 1
2	40	4 : 1	15 : 1
3	50	5 : 1	20 : 1

注：A. 卵磷脂浓度；B. 磷脂与胆固醇质量比；C. 卵磷脂与药物质量比。

正交试验结果显示，各因素对包封率的影响大小排序为 $C > A > B$ ，即卵磷脂与药物质量比为主要影响因素，卵磷脂与胆固醇质量比的影响最小。最佳制备工艺条件为 $A_2B_2C_2$ ，即卵磷脂浓度 40%，卵磷脂与胆固醇质量比 4 : 1，卵磷脂与药物质量比 15 : 1。

2.3.5 验证试验

按正交试验下最佳工艺条件平行制备 3 批样

表 2 正交试验结果 ($n = 3$)

Table 2. Orthogonal experiment results ($n = 3$)

序号	因素				包封率 (%)
	A	B	C	D (误差)	
1	50	5 : 1	10 : 1	3	57.84
2	30	4 : 1	20 : 1	3	56.57
3	50	3 : 1	20 : 1	2	51.79
4	30	5 : 1	15 : 1	2	58.63
5	40	5 : 1	20 : 1	1	55.41
6	50	4 : 1	15 : 1	1	61.96
7	40	4 : 1	10 : 1	2	67.79
8	40	3 : 1	15 : 1	3	65.38
9	30	3 : 1	10 : 1	1	58.64
K_1	173.84	175.81	184.27	176.01	
K_2	188.58	186.32	185.97	178.21	
K_3	171.59	171.88	163.77	179.79	
k_1	57.95	58.60	61.42	58.67	
k_2	62.86	62.11	61.99	59.40	
k_3	57.20	57.29	54.59	59.93	
R	5.663	4.810	7.400	1.260	

表3 正交试验方差分析 ($n=3$)
Table 3. Analysis of variance in orthogonal experiments ($n=3$)

方差来源	自由度	离均差平方和	方差	标准差	F	P
A	2	56.57	28.28	5.32	23.58	<0.05
B	2	36.99	18.50	4.30	15.42	>0.05
C	2	101.65	50.83	7.13	42.38	<0.05
D (误差)	2	2.40	1.20	1.09		

注: $F_{0.05}(2, 2)=19.00$, $F_{0.05}(2, 2)=99.00$ 。

品, 测得水蛭提取物脂质体包封率为67.37% ($n=3$), 载药量为5.39%。

2.4 水蛭提取物脂质体的表征

2.4.1 粒径、粒度分布、Zeta 电位测定

取适量脂质体混悬液, 加适量纯水稀释, 采用激光粒度仪测定其平均粒径为 (213.68 ± 7.16) nm, 粒度分布 (particle size distribution, PDI) 为 0.254 ± 0.02 , Zeta 电位为 (-32.05 ± 0.43) mV。

2.4.2 稳定性考察

水蛭提取物脂质体置于4℃条件下储存7、15、30 d, 测定脂质体包封率, 按以下公式计算渗漏率:

$$P = (EE_1 - EE_2) / EE_1 \times 100\%$$

式中, P 为渗漏率, EE_1 和 EE_2 分别为储存前后的包封率。结果见表4, 表明水蛭提取物脂质体在4℃条件下稳定性较好。

表4 脂质体稳定性考察结果 (% , $n=3$)
Table 4. Liposome stability study results (% , $n=3$)

时间 (d)	EE_1	EE_2	P
7		67.14	0.96
15	67.79	66.67	1.65
30		66.04	2.58

取同等浓度的水蛭提取物脂质体和水蛭提取物冻干粉末, 在4℃、相对湿度30%条件下分别保存30、90、180 d, 采用MTT法分别检测其对HSFb的增殖抑制率^[12], 结果水蛭提取物脂质体的增殖抑制率高于水蛭提取物, 见表5。

2.5 水蛭提取物脂质体温敏凝胶制备工艺优化

2.5.1 温敏凝胶制备

参考既往文献^[25]称取处方量1,2-丙二醇溶于处方量蒸馏水中, 再称取处方量P407和P188撒布于上述溶液表面, 4℃静置12 h, 溶胀至透明状且无杂质凝胶状。将水蛭提取物脂质体混悬

表5 水蛭提取物脂质体与水蛭提取物的HSFb细胞增殖抑制率比较 (% , $n=3$)
Table 5. Comparison of HSFb proliferation inhibition rates between leech extract liposomes and conventionally preserved leech extract (% , $n=3$)

时间 (d)	水蛭提取物脂质体	水蛭提取物
30	25.41 ^a	23.35
90	23.94 ^a	22.67
180	20.62 ^a	18.83

注: 与水蛭提取物比较, ^a $P < 0.05$ 。

液加入上述凝胶中搅拌混匀, 即得水蛭提取物脂质体温敏凝胶。同法, 将水蛭提取物加入上述凝胶中搅拌混匀, 即得水蛭提取物温敏凝胶。

2.5.2 胶凝温度测定方法

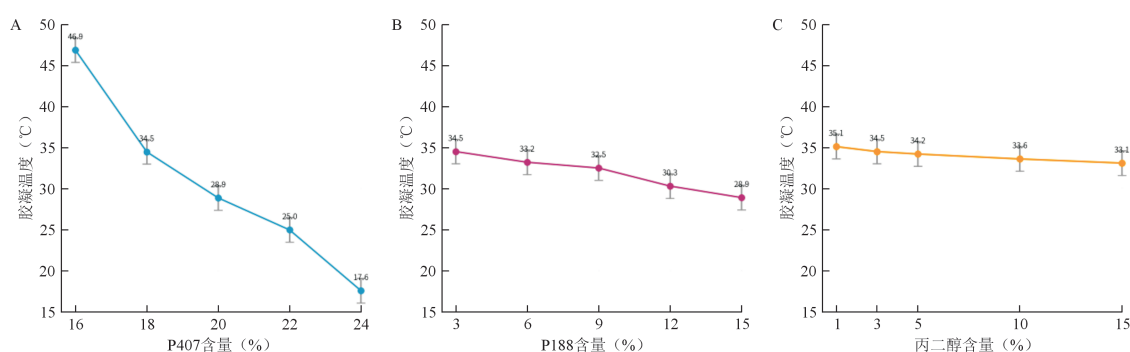
采用转子法测定温敏凝胶的胶凝温度^[26]。取15 g温敏凝胶置于烧杯中, 加入磁性转子, 转速100 r/min, 以1℃/min的速度升温, 当凝胶完全凝结时的温度即为胶凝温度。本品为皮肤外用制剂, 胶凝温度应高于环境温度(约25℃), 低于皮肤表面温度(约33℃), 最佳胶凝温度约32℃。

2.5.3 单因素试验

(1) P407 含量: 固定处方中试剂用量(P188 3%、丙二醇3%、脂质体混悬液20%), 改变P407的用量(16%、18%、20%、22%、25%), 按照“2.5.1”项下方法制备水蛭提取物脂质体温敏凝胶后, 测定胶凝温度。P407含量对胶凝温度的影响如图3-A所示, 当P407含量为18%~20%时, 胶凝温度接近33℃, 需进行交叉试验进一步优化。

(2) P188 含量: 固定处方中试剂用量(P407 18%、丙二醇3%、脂质体混悬液20%), 改变P188的用量(3%、6%、9%、12%、15%), 按“2.5.1”项下方法制备脂质体温敏凝胶后, 测定其胶凝温度。P188含量对于胶凝温度的影响如图3-B所示。当P188含量为6%~12%时, 胶凝温度更接近33℃, 需进行交叉试验进一步优化。

(3) 丙二醇含量: 固定处方中试剂用量(P188 3%、P407 18%、脂质体混悬液20%), 改变丙二醇的用量(1%、3%、5%、10%、15%), 按“2.5.1”项下方法制备脂质体温敏凝胶后, 测定其胶凝温度。丙二醇含量对于胶凝温度的影响如图3-C所示。试验结果显示丙二醇对胶凝温度的影响较小, 综合考量选取3%的丙二醇含量。

图3 P407、P188和丙二醇含量对胶凝温度的影响 ($n = 3$)Figure 3. The effect of P407, P188, and propylene glycol content on gelation temperature ($n = 3$)

注：A. P407 含量；B. P188 含量；C. 丙二醇含量。

2.5.4 交叉试验

图3-C结果显示，丙二醇对温度几乎没有影响，确定丙二醇用量为3%。P407作为温敏凝胶主要基质，浓度越高胶凝温度越低；浓度过低则无法形成稳定凝胶。依据图3-A，选定更接近人体肤表温度33℃的19% P407和浓度更高更稳定的20% P407进入交叉试验。P188作为调节剂加入体系能够削弱P407分子间疏水作用，改善凝胶柔韧性提升肤感。依据图3-B，选定肤感更好的9%、10%、11% P188进入交叉试验，制备温敏凝胶后测定胶凝温度，确定脂质体温敏凝胶最优制备工艺，结果见表6。当P407 18%、P188 10%、丙二醇3%、水蛭提取物脂质体20%时，其胶凝温度32.9℃，故选该处方作为最优处方。

表6 交叉试验结果

Table 6. Cross-experiment results

P407 (%)	P188 (%)	丙二醇 (%)	脂质体 (%)	胶凝温度 (°C)
18	9	3	20	33.7
18	10	3	20	32.9
18	11	3	20	32.1
19	9	3	20	31.4
19	10	3	20	30.8
19	11	3	20	30.6
20	9	3	20	28.0
20	10	3	20	27.3
20	11	3	20	26.9

2.5.5 验证试验

按“2.5.4”项下得出的最佳制备工艺条件，平行进行3组试验：称取3 mL丙二醇溶于49 mL蒸馏水中，再称取18 mg的P407和10 mg的P188撒布于其溶液表面，加入20 mg水蛭提取物脂质体冻干粉均匀分散在凝胶体系中，置4℃冰箱中

冷藏约12 h，至其充分溶胀至溶液呈透明状且无杂质。测得水蛭提取物脂质体温敏凝胶的胶凝温度为 $(33.1 \pm 0.66)^\circ\text{C}$ ($n=3$)，接近人体皮肤温度。

2.6 水蛭提取物脂质体温敏凝胶质量评价

2.6.1 外观观察

本产品为乳白色不透明凝胶，常温下呈液态，加热至33℃以上迅速凝结。

2.6.2 黏度测定

取50 mL脂质体温敏凝胶，分别在25℃、33℃水浴30 min，用旋转流变仪1.0RPM测定黏度，重复测3次取平均值。结果制备的水蛭提取物脂质体温敏凝胶在室温25℃下黏度为 $(184.7 \pm 13.4) \text{ mPa}\cdot\text{s}$ ，黏度较小、流动性较好；在皮肤温度33.5℃下黏度为 $(513.9 \pm 18.6) \text{ mPa}\cdot\text{s}$ ，黏度高，可延长凝胶在体表的滞留时间。

2.6.3 pH值测定

用pH计测定25℃时水蛭提取物脂质体温敏凝胶的pH值，结果为 4.63 ± 0.04 ($n = 3$)。表明制备的水蛭提取物脂质体温敏凝胶的pH值在皮肤适宜范围(4.5 ~ 6.5)内，可避免对患处皮肤的刺激性。

2.6.4 高温与低温试验

取脂质体温敏凝胶10 g于棕色西林瓶中，分别在40℃下和4℃下避光保存10 d，于第5和第10天取样测定载药量，按以下公式计算药物保留率：

$$\text{药物保留率} = C_n/C_0 \times 100\%$$

式中， C_n 为第 n 天载药浓度， C_0 为初始载药浓度。结果见表7，表明4℃条件下温敏凝胶稳定性较好，40℃下稳定性降低。

2.6.5 长期稳定性试验

取脂质体温敏凝胶10 g于棕色西林瓶中加盖

密封， $(4 \pm 1)^\circ\text{C}$ 保存6个月，于1、3、6月末取出样品，恢复至室温，平行测定3次，测定凝胶温度和载药量，按“2.6.4”项下公式计算药物保留率，结果见表8。提示在 4°C 条件下，温敏凝胶药物保留率和胶凝温度变化较小，说明水蛭提取物脂质体温敏凝胶稳定性良好。

表7 高温和低温试验结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 7. High and low temperature experimental results ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

时间 (d)	温度 ($^\circ\text{C}$)	药物保留率 (%)
5	4	98.9 ± 0.4
	40	92.6 ± 0.6
10	4	98.1 ± 0.3
	40	89.3 ± 1.5

表8 4°C 长期稳定性试验结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 8. Long-term stability test results at 4°C ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

时间 (d)	药物保留率 (%)	胶凝温度 ($^\circ\text{C}$)
30	98.5 ± 0.2	32.1 ± 0.3
90	97.7 ± 0.9	31.7 ± 0.1
180	96.2 ± 0.7	31.2 ± 0.4

2.6.6 皮肤刺激性实验

取10只大鼠，随机分为A、B2组。除去脊柱两侧 $2\text{ cm} \times 2\text{ cm}$ 面积的毛发，生理盐水擦拭至无可见污渍。将A组大鼠作为对照组涂抹空白基质，B组大鼠作为试验组涂抹水蛭提取物脂质体温敏凝胶，每日各涂抹一次，每次涂抹量为1 g，连续给药1周；在最后1次给药后6 h用温水洗去涂抹皮肤上残留的空白基质和温敏凝胶，再于1 h后观察，结果见图4。空白对照组与实验组均未引起大鼠皮肤产生红斑和水肿反应，说明水蛭提取物脂质体温敏凝胶无皮肤刺激性。

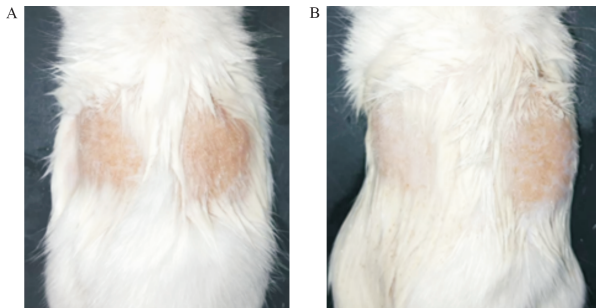


图4 水蛭提取物脂质体温敏凝胶皮肤刺激性实验结果
Figure 4. Skin irritation test results of leech extract liposome thermosensitive gel

注：A. 空白对照组，B. 实验组

2.6.7 体外透皮实验

采用Franz扩散池系统对水蛭提取物脂质体温敏凝胶的透皮给药性能进行研究。将SD大鼠皮肤样本固定在Franz扩散池的供给室和接收室之间，角质层朝向供给室，皮肤底部与接收池充分接触，以模拟药物透皮给药路径。Franz扩散池的供给室中加入不同药物，接收室中加入40 mL PBS ($\text{pH} = 7.4$) 模拟生理环境。 33°C 磁力搅拌保持与人体皮肤正常温度一致的实验条件。实验过程中，定时从接收室取样并添加等量的PBS，通过BCA法测定接收室样品中药物浓度。按以下公式计算特定时间段内介质中药物的累积浓度，得到药物的累积渗透量，进而评估水蛭提取物脂质体温敏凝胶的透皮给药率。

$$Q = (C_n \times V_0 + \sum_{i=n}^{n-1} C_i \times V_i) / A$$

式中， Q 为药物单位透皮渗透量 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)， C_n 、 C_i 为第 n 个和第 i 个取样点测得的浓度， V_i 为每次取样的体积 (0.2 mL)， V_0 为扩散池体积 (40 mL)， A 为皮肤扩散面积 (5 cm^2)。

以累积渗透量 Q 对时间 t 进行线性回归，取线性关系最佳的稳态渗透阶段，按以下公式计算稳态渗透速率 (steady-state flux, J_{ss}) 和表观渗透系数 (apparent permeability coefficient, P_{app})。

$$J_{ss} = (Q - b) / t$$

$$P_{app} = \frac{1}{AC_0} \times \frac{dQ}{dt}$$

式中， A 为膜的有效渗透面积； C_0 给药侧初始浓度； dQ/dt 为接收室浓度变化率，即稳态时累积透过量对时间作图所得直线的斜率。

为研究水蛭提取物脂质体温敏凝胶在透皮渗透时的药物释放特性，Franz扩散池的供给室中分别加入水蛭提取物、水蛭提取物温敏凝胶、水蛭提取物脂质体温敏凝胶。3组样品药物含量均为5 mg，且2种凝胶体积保持一致。实验过程中接收液药物浓度远低于其饱和浓度的1/10，满足漏槽条件，可保证药物透皮扩散的持续推动力，实验结果能真实反映制剂透皮特性。

结果如图5所示。稳态渗透阶段即3 ~ 7 h，水蛭提取物原药的 J_{ss} 为 $12.53\text{ }\mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$ ， $R^2 = 0.9912$ ， $P_{app} = 1.00$ ；水蛭提取物温敏凝胶的 J_{ss} 为 $35.34\text{ }\mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$ ， $R^2 = 0.9956$ ， $P_{app} = 2.82$ ；水蛭提取物脂质体温敏凝胶的 J_{ss} 为 $46.12\text{ }\mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$ ， $R^2 = 0.9978$ ， $P_{app} = 3.68$ 。

3种制剂稳态阶段线性关系良好。水蛭提取物脂质体温敏凝胶的 J_{ss} 分别是水蛭提取物温敏凝胶的1.31倍、水蛭提取物的3.68倍；Papp同样显著提升，表明水蛭提取物脂质体温敏凝胶可加快药物透皮速率并改善渗透效率。对3组 J_{ss} 及9 h累积渗透量进行组间比较，结果3组间差异有统计学意义($F=86.37$, $P<0.05$)；多重比较结果表明，水蛭提取物脂质体温敏凝胶显著高于水蛭提取物温敏凝胶和水蛭提取物，而水蛭提取物温敏凝胶也显著高于水蛭提取物。

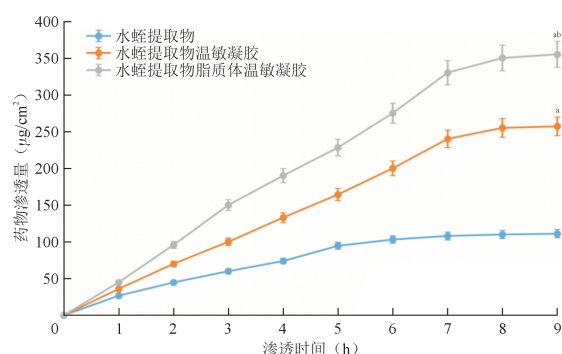


图5 药物透皮释放性能对比

Figure 5. Comparison of drug transdermal release performance

注：与水蛭提取物比较，^a $P<0.05$ ；与水蛭提取物温敏凝胶比较，^b $P<0.05$ 。

3 讨论

本研究针对水蛭提取物中多肽类成分易降解、透膜能力差的问题，制备水蛭提取物脂质体温敏凝胶，研究其理化性质。结果表明，水蛭提取物脂质体温敏凝胶可以促进药物渗透。

对于传统抗瘢痕药物而言，医用硅酮凝胶仅有物理水合作用无深层药理活性，渗透力较弱，需一天内多次给药。脂质体温敏凝胶 J_{ss} 在体外透皮实验中是普通凝胶组的1.31倍、原药组的3.68倍；表观渗透系数同样相较普通凝胶组和原药组有所提升，表明脂质体温敏凝胶可加快药物透皮速率并改善渗透效率，药物凝胶化后不易流失不沾染衣物，在局部停留时间延长可减少给药次数；糖皮质激素和氟尿嘧啶为注射剂，需要医生进行有创操作，长期使用有皮肤萎缩风险。脂质体温敏凝胶作为外用凝胶剂可以避免病灶内注射的剧痛，更适合儿童以及面部瘢痕患者。无需医护操作，降低就医成本减少时间负担。药物主要富集于皮肤局部，可规避激素的全身不良反应。

脂质体制备过程中，随着卵磷脂与胆固醇比的增加，包封率先升高再降低。因为胆固醇镶嵌于卵磷脂膜影响膜流动性，减少卵磷脂氧化提高包封率。但胆固醇过量会破坏卵磷脂膜结构导致包封率降低。体外透皮实验中，水蛭提取物脂质体温敏凝胶的药物透皮率大于普通凝胶组大于原药组。预测脂质体温敏凝胶可能滞留在皮肤中实现缓慢释药，增加了药物穿透生物膜的能力。脂质体作为载药中间体，其纳米结构有效封装药物，在皮肤表面以及皮肤内部充当可控释放的药物储存库，使更多药物跨皮肤屏障吸收，进一步增加水蛭提取物的渗透性。温敏凝胶的生物黏附性质有助于增强渗透性，增加了皮肤表皮鳞状层的水合作用并提高了其对药物的渗透能力。

后续拟对脂质体结构进行修饰以进一步提高载药量，同时开展其干预增生性瘢痕最佳给药时期的研究，在分子层面进行机制验证如Western Blot或PCR检测相关蛋白或基因表达。开展工艺放大验证实验，为后续规模化生产提供参考。

参考文献

- 1 中国药典2025年版.一部[S]. 2025: 88.
- 2 贾荟瑾, 许宏, 黄英, 等. 药用水蛭的化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国饲料, 2024(9): 162–166. [Jia HJ, Xu H, Huang Y, et al. Research progress on the chemical composition and medicinal use of leeches[J]. China Feed, 2024(9): 162–166.] DOI: 10.15906/j.cnki.cn11-2975/s.2023040038–04.
- 3 中国整形美容协会瘢痕医学分会常务委员会专家组. 中国瘢痕疙瘩临床治疗指南[J]. 中国美容整形外科杂志, 2018, 29(5): 245–256. [Expert Group of the Standing Committee of the Scar Medicine Branch of the Chinese Association of Plastic and Aesthetic Surgery. Recommended guidelines for clinical treatment of keloids in China[J]. Chinese Journal of Aesthetic and Plastic Surgery, 2018, 29(5): 245–256.] DOI: 10.3969/j.issn.1673-7040.2018.05.001.
- 4 苏斌, 王志斌, 宋程程, 等. 水蛭抗凝血作用实验研究[J]. 山东中医杂志, 2014, 33(11): 920–923. [Su B, Wang ZB, Song CC, et al. Experimental study on the anticoagulant effect of leeches[J]. Shandong Journal of Traditional Chinese Medicine, 2014, 33(11): 920–923.] DOI: 10.16295/j.cnki.0257-358x.2014.11.032.
- 5 冯光军, 朱正光, 余传林, 等. 水蛭乙醇提取物体外抗凝血活性研究[J]. 中药材, 2007, 30(8): 909–911. [Feng GJ, Zhu ZG, Yu CL, et al. Study on the *in vitro* anticoagulant activity of ethanol extract of leech[J]. Chinese Medicinal Materials, 2007, 30(8): 909–911.] DOI: 10.13863/j.issn.1001-4454.2007.08.015.
- 6 金家金, 王志斌, 苏斌, 等. 水蛭体外抗凝血实验研究及其生物活性测定方法反应体系的筛选[J]. 中国药理学杂志, 2014, 49(22): 1997–2001. [Jin JJ, Wang ZB, Su B, et al. *In vitro* anticoagulant experiments of leeches and the screening of reaction systems for

- measuring their biological activity[J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2014, 49(22): 1997–2001.] DOI: [10.11669/cpj.2014.22.009](#).
- 7 Tessler M, Marancik D, Champagne D, et al. Marine leech anticoagulant diversity and evolution[J]. J Parasitol, 2018, 10(3): 210–220. DOI: [10.1645/17–64](#).
- 8 Maria RM, Sergio M. From ancient leech to direct thrombin inhibitors and beyond: new from old[J]. Biomed Pharmacother, 2022, 149: 112878. DOI: [10.1016/j.biopha.2022.112878](#).
- 9 鲍宗麟, 杨文, 解增金, 等. 水蛭治疗慢性病毒性肝炎疗效观察[J]. 浙江中西医结合杂志, 2000, 10(9): 520–521. [Bao ZL, Yang W, Xie ZJ, et al. Observation on the efficacy of leech therapy in treating chronic viral hepatitis[J]. Zhejiang Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, 2000, 10(9): 520–521.] DOI: [10.3969/j.issn.1005–4561.2000.09.003](#).
- 10 郑进福, 陈俊辉, 马华蛟. 水蛭栓剂治疗慢性前列腺炎效果评价[J]. 深圳中西医结合杂志, 2017, 27(17): 74–76. [Zheng JF, Chen JH, Ma HW. Evaluation of the effect of leech suppositories in the treatment of chronic prostatitis[J]. Shenzhen Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, 2017, 27(17): 74–76.] DOI: [10.16458/j.cnki.1007–0893.2017.17.037](#).
- 11 刘京生, 苗智慧, 董力, 等. 水蛭抗肿瘤作用的实验研究[J]. 时珍国医国药, 2001, 12(10): 884–885. [Liu JS, Miao ZH, Dong L, et al. Experimental study on the anti-tumor effects of leeches[J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2001, 12(10): 884–885.] DOI: [10.3969/j.issn.1008–0805.2001.10.010](#).
- 12 李小菊, 卢宏达, 陈卫群, 等. 水蛭抑制肿瘤血管生成的作用及其机制[J]. 肿瘤防治研究, 2013, 40(1): 46–50. [Li XJ, Lu HD, Chen WQ, et al. The effect of leeches on inhibiting tumor angiogenesis and its mechanism[J]. Tumor Prevention and Treatment Research, 2013, 40(1): 46–50.] DOI: [10.3971/j.issn.1000–8578.2013.01.012](#).
- 13 王宏涛, 李春志, 肖顺林, 等. 水蛭乙醇提取物对大鼠血脂和一氧化氮及其合酶影响[J]. 中国现代医药杂志, 2008, 10(5): 24–26. [Wang HT, Li CZ, Xiao SL, et al. Effects of ethanol extract of leech on blood lipids, nitric oxide, and its synthase in rats[J]. Chinese Journal of Modern Medicine, 2008, 10(5): 24–26.] DOI: [10.3969/j.issn.1672–9463.2008.05.008](#).
- 14 盛丽. 水蛭抗肺纤维化作用及其机制的研究[D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2006. https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=Ei7Li4TQaLxAufc37P8jIfqRzBXDwcVMTlvTsgRZM3thXZ6BUMEQyYxOgUni0b4U9C–7zLlpv5tPpSs9lRtgb4XYjAPoWitCT7StfsGOC_1eiR22tTyIx9M7CdG2dbo_IW8A6fMedrIdOdGAj0U6JZOhjpNte–KTz9MHIXLc7hjF_9bkmXNw== &uniplatform=NZKPT&language=CHS.
- 15 陆瑾瑜. 水蛭调控 JAK2/STAT3 信号通路减轻 IgA 肾病大鼠肾脏纤维化的机制研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2024. DOI: [10.27433/d.cnki.gxyku.2024.001028](#).
- 16 Bal NB, Han S, Kiremitci S, Sadi G, et al. Hypertension-induced cardiac impairment is reversed by the inhibition of endoplasmic reticulum stress[J]. J Pharm pharmacol, 2019, 71(12): 1809–1821. DOI: [10.1111/jphp.13169](#).
- 17 Dong H, Ren JX, Wang JJ, et al. Chinese medicinal leech ethnopharmacology, phytochemistry, and pharmacological activities[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2016, 12: 1. DOI: [10.1155/2016/7895935](#).
- 18 李国强, 李韵仪, 李桃, 等. 水蛭的化学成分研究[J]. 天津中医药, 2018, 35(9): 703. [Li GQ, Li YY, Li T, et al. Study on the chemical composition of leeches[J]. Tianjin Journal of Traditional Chinese Medicine, 2018, 35(9): 703.] DOI: [10.11656/j.issn.1672–1519.2018.09.17](#).
- 19 Zhang ZY, Ma N, Tao LJ, et al. Linear peptides containing d-leucine with neuroprotective activities from the leech *Whitmania pigra* Whitman[J]. J Nat Prod, 2019, 82(8): 2349. DOI: [10.1021/acs.jnatprod.9b00322](#).
- 20 陈中会, 陈斌. 脂质体在药物递送系统中的研究与应用进展[J]. 中国药理学杂志(网络版), 2026, 24(3): 136–150. [Chen ZH, Chen B. Research and application progress of liposomes in drug delivery system[J]. Chinese Journal of Pharmaceutics(Online Edition), 2026, 24(3): 136–150.] DOI: [10.14146/j.cnki.cjp.2026.03.003](#).
- 21 周楠. 壳聚糖基生物力学仿生多功能温敏性水凝胶敷料的研究[D]. 成都: 西南交通大学, 2024. DOI: [10.27414/d.cnki.gxnju.2024.003434](#).
- 22 姚琳, 王伟明, 张妍妍, 等. 中药水蛭提取及精制工艺的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(3): 31–33. [Yao L, Wang WM, Zhang YY, et al. Studies on extraction and purification technology of Chinese medicine leeches[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2011, 17(3): 31–33.] DOI: [10.13422/j.cnki.syfx.2011.03.018](#).
- 23 黄伟, 邓斌, 王议娴, 等. 水蛭素的 HPLC 色谱分析条件优化研究[J]. 中国农学通报, 2024, 40(11): 142–147. [Huang W, Deng B, Wang YX, et al. Optimization of HPLC conditions for analysis of hirudin[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2024, 40(11): 142–147.] DOI: [10.1016/S0140–6736\(16\)31406–4](#).
- 24 Jeon S, Yoo CY, Park SN. Improved stability and skin permeability of sodium hyaluronate–chitosan multilayered liposomes by Layer-by-Layer electrostatic deposition for quercetin delivery[J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2015, 129: 7–14. DOI: [10.1016/j.colsurf.2015.03.018](#).
- 25 高晓非, 文晓静. 乙醇沉淀–二喹啉甲酸法测定含脂类样品中蛋白质的含量[J]. 医药导报, 2010, 29(12): 1630–1633. [Gao XF, Wen XJ. Determination of protein content in lipid-containing samples by ethanol precipitation–2,2′-bipyridine–5,5′-dicarboxylic acid method[J]. Medical Herald, 2010, 29(12): 1630–1633.] DOI: [1004–0781\(2010\)12–1630–04](#).
- 26 宋婷婷, 罗珊, 何碧玉, 等. 茶多酚脂质体温敏凝胶的制备工艺研究[J]. 遵义医科大学学报, 2021, 44(1): 121–126. [Song TT, Luo S, He BY, et al. Study on the preparation process of tea polyphenol liposome thermosensitive gel[J]. Journal of Zunyi Medical University, 2021, 44(1): 121–126.] DOI: [10.14169/j.cnki.zunyixuebao.2021.0018](#).

收稿日期: 2026 年 02 月 04 日 修回日期: 2026 年 05 月 25 日
本文编辑: 李 阳 洗静怡