

含挥发油及多种极性成分的白脉复方脂质体包封率测定方法比较研究

李诗艳¹, 肖五庆^{1,3}, 刘铸源¹, 苗雅秋¹, 张海桐¹, 李加玲¹, 权子文¹, 武慧超^{2*}, 杜守颖^{1*}

1. 北京中医药大学中药学院, 北京 102488

2. 北京中医药大学中医学院 民族医药学研究所, 北京 102488

3. 湖南洞庭药业股份有限公司, 湖南 常德 415001

摘要: **目的** 考察适用于测定白脉复方脂质体 (BM-Lip) 包封率的方法。 **方法** 以前期已成功制备的、同时包载了挥发油、姜黄素、甘草酸和甘草苷的 BM-Lip 为研究对象, 以白脉复方中挥发油、甘草苷、甘草酸和姜黄素含量为评价指标, 对超滤离心法、葡聚糖凝胶柱法、鱼精蛋白凝聚法、超速离心法 4 种分离方法在测定 BM-Lip 包封率时的适用性进行考察。 **结果** 当采用超滤离心管 (截留相对分子质量 3 000) 以 13 000 r/min 离心 20 min 时, 游离药物中挥发油、甘草酸和姜黄素的回收率偏低; 在以 20% 乙醇为洗脱剂、体积流量 1.0 mL/min 时, 无论葡聚糖凝胶柱的径高比为 1:15 还是 1:20, 脂质体与游离挥发油的流出间隔时间均过短, 且难以通过优化手段进行改善; 此外, 3 种不同来源的鱼精蛋白以及鱼精蛋白的不同加入量 (1~3 倍体积量) 对 BM-Lip 的凝聚度均未产生显著影响, 而在 4 ℃ 下 17 000 r/min 离心 60 min 时, 虽然 BM-Lip 获得高凝聚度, 但游离药物的回收率却均不符合测定要求; 然而, 在 4 ℃ 下 40 000 r/min 高速离心 60 min 时, 测得游离药物中挥发油、甘草苷、甘草酸和姜黄素的平均回收率在 96.29%~101.95%, 同时, 空白脂质体与游离药物的物理混合物的平均加样回收率中, 甘草苷、甘草酸和姜黄素在 97.35%~106.10%, 挥发油在 80.22%~85.26%, 符合测定要求。根据这些条件最终测得挥发油、甘草苷、甘草酸和姜黄素的包封率分别为 (76.15±0.16) %、(10.15±1.41) %、(7.09±0.57) % 和 (84.08±1.03) %。 **结论** 采用超速离心法时各成分的回收率测定结果良好, 表明该分离方法可用于准确测定 BM-Lip 的包封率; 为后续 BM-Lip 制剂过程的系统优化提供了重要基础, 也为同时测定含有不同极性组分的中药复方脂质体包封率提供了有价值的参考。

关键词: 白脉软膏; 共载脂质体; 包封率; 超滤离心法; 葡聚糖凝胶柱法; 鱼精蛋白凝聚法; 超速离心法; 挥发油; 甘草苷; 甘草酸; 姜黄素

中图分类号: R283.6

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2025)11-3844-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.11.007

Comparative study on determination methods for encapsulation rate of Baimai Compound Liposomes containing volatile oil and various polar components

LI Shiyan¹, XIAO Wuqing^{1,3}, LIU Zhuyuan¹, MIAO Yaqiu¹, ZHANG Haitong¹, LI Jialing¹, QUAN Ziwen¹, WU Huichao², DU Shouying¹

1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

2. Institute of Ethnic Medicine, School of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

3. Hunan Dongting Pharmaceutical Co., Ltd., Changde 415001, China

Abstract: **Objective** To investigate the method applicable to the determination of the encapsulation rate of Baimai Compound liposomes (BM-Lip). **Methods** The BM-Lip successfully prepared in the previous stage and simultaneously encapsulated with volatile oil, curcumin, glycyrrhizic acid and glycyrrhizin was used as the object of study, and the content of volatile oil, glycyrrhizic

收稿日期: 2025-01-06

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (82474201); 国家自然科学基金青年项目 (82104545); 中央高校基本科研业务费专项资金资助 (2023-JYB-JBQN-043)

作者简介: 李诗艳 (2002—), 女, 硕士研究生, 主要从事中药新剂型新技术研究。E-mail: lsymiracle1004@163.com

*通信作者: 杜守颖, 博士, 教授, 主要从事中药新剂型新技术研究。Tel: (010)84738615 E-mail: dushouying@263.net

武慧超, 博士, 副研究员, 主要从事民族医药新技术与新方法研究。Tel: (010)64286010 E-mail: wuhuichao1011@126.com

acid, glycyrrhizic acid and curcumin in the Baimai Compound was used as the index of evaluation, the applicability of four separation methods, including ultrafiltration centrifugation method, dextran gel elution, protamine aggregation method, and ultracentrifugation, for the determination of encapsulation rate of the BM-Lip was examined. **Results** The results showed that when a ultrafiltration centrifuge tube (3 000 relative molecular mass retained) was used to centrifuge the free drug at 13 000 r/min for 20 min, the recoveries of volatile oil, glycyrrhetinic acid, and curcumin were low; when 20% ethanol was used as the eluent at a volumetric flow rate of 1.0 mL/min, the elution time intervals between the liposomes and free volatile oils were too short, regardless of whether the diameter-to-height ratio of the dextran gel column was 1 : 15 or 1 : 20 and it was difficult to improve by optimization; moreover, the three different sources of protamine and the different addition amounts (1—3 times the volume) did not significantly affect the cohesion of BM-Lip, but when centrifuged at 17 000 r/min for 60 min at 4 °C, although BM-Lip gained a high degree of cohesion, the recoveries of the free drug were not in compliance with the requirements of the assay; however, the recoveries of free drug were not in accordance with the requirements of the assay when centrifuged at 4 °C for 60 min at 40 000 r/min. However, when centrifuged at a high speed of 40 000 r/min for 60 min, the average recoveries of volatile oil, glycyrrhizin, glycyrrhetinic acid and curcumin in the free drug were measured between 96.29% and 101.95%, which met the requirements of determination. Meanwhile, the average spiked recoveries of the physical mixtures of blank liposomes and free drug ranged from 97.35% to 106.10% for glycyrrhizin, glycyrrhizic acid and curcumin, and from 80.22% to 85.26% for volatile oil. The encapsulation rates of volatile oil, glycyrrhizin, glycyrrhizic acid and curcumin were measured to be $(76.15 \pm 0.16)\%$, $(10.15 \pm 1.41)\%$, $(7.09 \pm 0.57)\%$ and $(84.08 \pm 1.03)\%$, respectively, according to these conditions. **Conclusion** In conclusion, the good results of the recovery determination of each component by ultracentrifugation indicated that this separation method can be used to accurately determine the encapsulation rate of BM-Lip. This study not only provides an important basis for the systematic optimization of the subsequent process of BM-Lip, but also provides a valuable reference for the determination of the encapsulation rate of liposomes of traditional Chinese medicine compound prescriptions that contain different polar components at the same time.

Key words: Baimai Ointment; co-loaded liposomes; encapsulation rate; ultrafiltration centrifugation method; dextran gel column method; protamine aggregation method; ultracentrifugation; volatile oil; liquiritin; glycyrrhizic acid; curcumin

白脉软膏是藏医用于治疗白脉病的经典复方外用制剂, 应用历史悠久, 在藏医学经典论著《藏医临床札记》中可见详细记载^[1]。该复方方剂组成包括姜黄、肉豆蔻、干姜等 11 味中药, 是一个富含挥发油、兼具亲水性成分和亲脂性成分的复杂体系。白脉软膏的传统制备方式为原粉入药, 该传统制剂未对方药物进行提取、纯化等预处理, 导致其应用时存在有效成分释放效率低、深层渗透性及制剂质量稳定性差等缺陷, 影响其疗效稳定性^[2-3]。脂质体因其所含磷脂等两性分子的结构特殊性, 可实现挥发油、脂溶性成分和水溶性成分的良好包载^[4-5]及有效经皮递送^[6], 成为一种理想的药物载体。故课题组在前期研究中, 将白脉软膏进行处方优化后, 以其中的挥发油部位、脂溶性成分 (以姜黄素为代表) 以及水溶性成分 (以甘草苷和甘草酸为代表) 为主要组分, 成功制备出白脉复方脂质体 (Baimai compound liposomes, BM-Lip), 以提高其疗效和临床应用价值。

脂质体的包封率指被包裹物质 (如某药物) 在脂质体悬液中占药物总量的百分量, 反映了药物被载体包封的程度, 其直接影响药物在体内的疗效, 是脂质体质量控制的一个重要指标^[7]。为此, 在测

定脂质体包封率时, 需确保脂质体与游离药物的有效分离, 并选用恰当的分析方法进行定量分析^[8]。然而, 中药复方脂质体作为一个复杂体系, 其往往同时包载了挥发油、水溶性成分和脂溶性成分等多种性质的组分, 在测定这类脂质体的包封率时, 如何实现脂质体与游离药物的有效分离, 并精准地对各组分进行定量评估, 一直是其制备过程中的难题之一。

在测定包封率的过程中, 常用的分离方法包括离心法、超滤离心法、葡聚糖凝胶柱法、鱼精蛋白凝聚法、微柱离心法、透析法等, 不同分离手段背后的原理各不相同。离心法主要是基于脂质体与游离药物的密度差异, 在适当的离心条件下完成两者的分离, 根据离心转速的不同, 该方法又可细分为低速离心法和超速离心法; 超滤离心法则是将脂质体置于配置有超滤膜的超滤管中, 在适当的转速下进行离心, 在离心力作用下, 游离药物能够通过超滤膜, 而脂质体则被超滤膜截留, 从而实现两者的分离; 葡聚糖凝胶柱法和微柱离心法均采用溶胀后的葡聚糖凝胶颗粒作为固定相, 这些葡聚糖颗粒在溶胀后可形成凝胶状结构, 其内部具有适当大小的孔径, 小分子游离药物可进入这些孔径内, 从而实

现一定程度的保留,而由于脂质体的粒径大,因此能够更快地被洗脱下来;鱼精蛋白凝聚法则是通过带有正电荷的鱼精蛋白与带负电荷或电中性的脂质体结合形成聚合物,进而增加其密度,在常规离心条件下即可实现脂质体与游离药物的分离。

鉴于 BM-Lip 的共载体系中包含了复杂的挥发油成分,以及极性差异显著的姜黄素、甘草苷和甘草酸,目前,尚未有能够同时满足这些不同性质药物分离的理想纯化方法,故需要针对所包载特定成分的性质对现有各分离方法进行相应调整与考察,以满足准确测定该多组分共载脂质体包封率的要求。因此,本研究以 BM-Lip 为研究对象,分别建立挥发油定量测定的紫外可见分光光度法和姜黄素、甘草苷及甘草酸定量测定的 HPLC 法,并对超滤离心法、葡聚糖凝胶柱法、鱼精蛋白凝聚法和超速离心法进行深入考察,旨在评估这些方法对准确测定 BM-Lip 包封率的适用性,以期为后续 BM-Lip 制备工艺的进一步优化提供重要基础。

1 仪器与材料

1.1 仪器

TU-1810 型紫外可见分光光度计(全波长扫描用),北京普析通用仪器有限责任公司;P1 型紫外可见分光光度计(含量测定用),上海美谱达仪器有限公司;Thermo Ultimate 3000 型高效液相色谱仪,TCC-3000SD 型检测器,赛默飞世尔科技有限公司;Waters Xselect® HSS T3 C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm);04711-35 型超声波破碎仪,北京中科科尔仪器有限公司;Epoch 型酶标仪,BioTek Instruments, Inc.;Optima XPN-100 Ultracentrifuge 型超高速离心机,美国贝克曼库尔特有限公司;Merck Millipore 3 kD 型超滤离心管,截留相对分子质量 3 000,北京拜尔迪生物技术有限公司;HC-2517 型高速离心机,安徽中科中佳科学仪器有限公司。

1.2 试药

白脉复方药粉,批号 20220308,西藏奇正藏药股份有限公司;白脉复方挥发油,水蒸气蒸馏法自提;对照品甘草苷(质量分数 93.1%,批号 111610-201607)、甘草酸铵(质量分数 96.2%,批号 110731-202021)、姜黄素(质量分数 98.1%,批号 110823-202107)、硫酸鱼精蛋白(来源于鲑鱼,批号 150522-201601),中国食品药品检定研究院;原料药甘草苷(质量分数 98.0%,批号 Z07J12X136344)、甘草酸(质量分数 95.0%,批号 G13J11L115734)、姜黄素

(质量分数 95.0%,批号 R12A10S85604)、大豆卵磷脂(批号 579010-1150055-13);胆固醇(质量分数 95.0%,批号 L26N11F132572),上海源叶生物科技有限公司;葡聚糖凝胶 G-50, 50~150 μm,批号 20210120,北京拜尔迪生物技术有限公司;Sigma 硫酸鱼精蛋白(来源于鲑鱼),批号 1003433745,西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;硫酸鱼精蛋白注射液(5 mL:50 mg),批号 2109201,上海上药第一生化药业有限公司;无水甲醇、无水乙醇、磷酸等试剂均为国产分析纯;水为娃哈哈纯净水。

2 方法与结果

2.1 BM-Lip 的制备

采用课题组前期研究^[3,9-11]确定的微流体技术制备 BM-Lip 方法,制备包载挥发油、姜黄素、甘草酸及甘草苷的 BM-Lip,相同方法制备不含药物的空白脂质体。

2.2 挥发油定量测定方法的建立

2.2.1 样品准备

(1)溶液组:取白脉复方挥发油、姜黄素适量,无水乙醇作溶剂,分别配制质量浓度为 0.830 mg/mL 的挥发油溶液、质量浓度为 0.064 mg/mL 的姜黄素溶液;取甘草酸、甘草苷适量,用纯净水配制甘草酸、甘草苷质量浓度分别为 0.085、0.021 mg/mL 的混合溶液。

(2)脂质体组:采用微流体法制备含挥发油的 BM-Lip 组、不含挥发油的 BM-Lip 组及空白脂质体组,制剂中各成分质量浓度与溶液组一致。

2.2.2 紫外-可见光全波长扫描 溶液组用甲醇稀释 100 倍,以甲醇为参照;脂质体组用甲醇稀释 50 倍,以空白脂质体相应稀释液为参照,进行 190~800 nm 紫外-可见光全波长扫描。结果如图 1 所示,213 nm 与 235 nm 是挥发油的特征吸收峰,其中 235 nm 下其他成分无干扰。故后续均采用 235 nm 作为

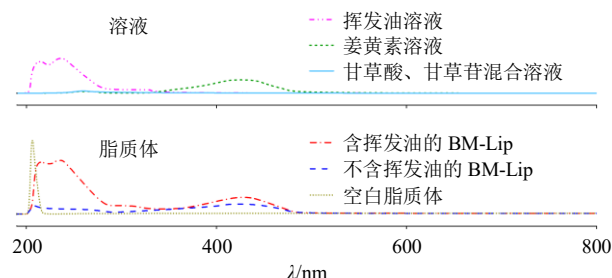


图 1 紫外-可见光全波长光谱扫描曲线

Fig. 1 Ultraviolet-visible full wavelength spectral scanning curve

挥发油定量检测的波长,专属性良好。

2.2.3 线性关系考察 称取 0.02 g 白脉复方挥发油于 250 mL 量瓶中,甲醇定容,配制 80 mg/L 的白脉复方挥发油标准储备液,用甲醇进一步稀释成质量浓度分别为 3.2、4.8、6.4、8.0、9.6、11.2、12.8、16.0 mg/L 的系列标准溶液,测定各溶液的吸光度(A)值。以白脉复方挥发油质量浓度为横坐标(X), A 值为纵坐标(Y),绘制标准曲线,进行线性回归,得回归方程 $Y=0.0415X+0.0053$, $r=0.9994$,挥发油溶液在 3.2~16.0 mg/L 有良好的线性关系。

2.2.4 精密度考察 精密移取 1.2 mL 白脉复方挥发油标准储备液,用甲醇定容至 10 mL,测定溶液的 A 值 6 次,挥发油溶液的质量浓度均值为 9.551 0 mg/L, RSD 为 0.13%,结果表明该仪器精密度良好。

2.2.5 稳定性考察 精密移取 1.2 mL 白脉复方挥发油标准储备液,用甲醇定容至 10 mL,分别在制备后 0、1、2、3、4、5、6 h 时测定溶液的 A 值,挥发油溶液的质量浓度均值为 9.848 2 mg/L, RSD 为 2.94%,挥发油溶液在 6 h 内能保持稳定。

2.3 甘草苷、甘草酸及姜黄素定量测定方法的建立

2.3.1 溶液配制

(1) 对照品溶液:取甘草苷、甘草酸铵^[12]、姜黄素对照品适量,加甲醇溶解,定容,配制含甘草苷 24.00 $\mu\text{g/mL}$ 、甘草酸铵 97.99 $\mu\text{g/mL}$ 、姜黄素 72.00 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品储备液。精密移取混合对照品储备液适量,加甲醇稀释定容,配制含甘草苷 4.80 $\mu\text{g/mL}$ 、甘草酸铵 19.60 $\mu\text{g/mL}$ 、姜黄素 14.40 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液。

(2) 样品溶液:将“2.1”项中 BM-Lip 及空白脂质体溶液,用甲醇稀释 4 倍后,250 W 超声破乳 10 min,分别作为供试品溶液及阴性对照溶液。

2.3.2 色谱条件 Waters Xselect[®] HSS T3 C₁₈ (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱;柱温 30 $^{\circ}\text{C}$ 。以乙腈和 0.1%磷酸水溶液作为流动相,进行梯度洗脱:0~5 min, 19%乙腈;5~12 min, 19%~50%乙腈;12~25 min, 50%~75%乙腈;25~30 min, 75%~85%乙腈;30~35 min, 85%乙腈;35~40 min, 85%~19%乙腈;40~45 min, 19%乙腈;体积流量 1.0 mL/min;检测波长 237 nm (甘草苷、甘草酸), 430 nm (姜黄素);进样体积 20 μL 。

2.3.3 专属性试验 取样品溶液、对照品溶液及阴性对照溶液进样分析,结果见图 2, 237 nm 波长下甘草苷、甘草酸铵的保留时间分别为 10.410、15.420

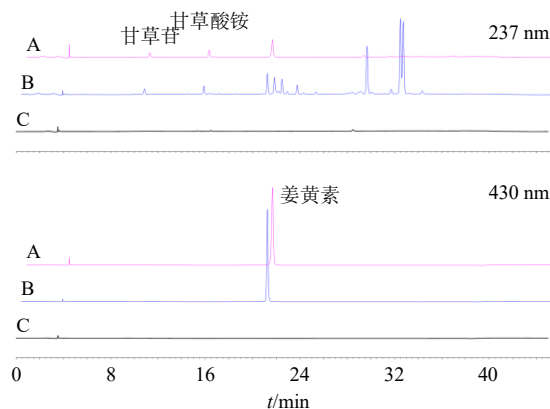


图 2 混合对照品溶液 (A)、BM-Lip (B)、空白脂质体 (C) 在 237、430 nm 波长下的 HPLC 图

Fig. 2 HPLC of BM-Lip (A), mixed control solution (B), blank liposomes (C) at 237, 430 nm

min, 430 nm 波长下姜黄素保留时间为 20.783 min, 各成分峰形良好,分离度均大于 1.5,且空白制剂溶液对测定无干扰,该方法专属性好,可用于甘草苷、甘草酸及姜黄素的定量测定。

2.3.4 线性关系考察 精密移取混合对照品储备液适量,采用甲醇稀释,制备得到质量浓度分别为 0.48、2.40、4.80、9.60、14.40、24.00 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液,分别进样测定。以对应成分的质量浓度为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y),分别绘制甘草苷、甘草酸铵及姜黄素的标准曲线,进行线性回归,得回归方程分别为甘草苷 $Y=0.3388X-0.0261$, $r=0.9999$,线性范围 0.48~24.00 $\mu\text{g/mL}$;甘草酸铵 $Y=0.1538X-0.2679$, $r=0.9992$,线性范围 1.96~97.99 $\mu\text{g/mL}$;姜黄素 $Y=2.6417X-0.7661$, $r=0.9999$,线性范围 1.44~72.00 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.3.5 精密度考察 取混合对照品溶液连续进样 6 次,记录甘草苷、甘草酸铵及姜黄素峰面积,计算得 3 种成分峰面积 RSD 值分别为 0.75%、0.63%、0.46%,结果表明该仪器精密度良好。

2.3.6 稳定性考察 取同一份供试品溶液,分别于制备后 0、2、4、6、8、12、24 h 时进样,记录甘草苷、甘草酸铵及姜黄素峰面积,计算得 3 种成分峰面积 RSD 值分别为 0.97%、0.93%、0.57%,各成分稳定性 RSD 均小于 3%,表明 3 种成分在 24 h 内稳定。

2.3.7 重复性考察 精密移取同一 BM-Lip 样品适量,共 6 份,按照“2.3.1”项下方法制备供试品溶液进行测定,记录甘草苷、甘草酸铵及姜黄素峰面积,计算得 3 种成分峰面积 RSD 值分别为 2.44%、

2.92%、2.41%，各成分峰面积 RSD 值均小于 3%，表明该方法重复性良好。

2.3.8 加样回收率考察 精密移取混合对照品储备液 0.55、1.10、1.70 mL 分别置于 5 mL 量瓶中，各加入 1 mL 空白脂质体，用甲醇配制成低、中、高 3 个质量浓度的待测液（相当于 BM-Lip 中各成分含量的 50%、100%、150%^[13]），甲醇稀释 1 倍，超声破乳后进样分析，按标准曲线进行定量，测得量相对于加入量的百分比为回收率。计算得低、中、高质量浓度甘草苷的平均加样回收率分别为 95.33%、99.70%、101.41%，RSD 分别为 0.97%、2.27%、2.37%，低、中、高质量浓度甘草酸铵的平均加样回收率分别为 102.65%、97.56%、102.39%，RSD 分别为 2.53%、2.28%、0.82%，低、中、高质量浓度姜黄素的平均加样回收率分别为 104.42%、100.18%、99.92%，RSD 分别为 0.48%、1.71%、1.83%，回收率符合要求，表明该方法准确度良好。

2.4 BM-Lip 包封率测定方法考察

2.4.1 溶液准备 按照“2.1”项下确定的挥发油及各组分间配比，称取挥发油、姜黄素、甘草酸和甘草苷适量，无水乙醇定容，制备质量浓度为 1.384 mg/mL（按挥发油计）的混合对照储备液。取混合对照储备液适量，用无水乙醇逐级稀释成高、中、低 3 个不同质量浓度的混合对照溶液（1.384、0.830、0.519 mg/mL，按挥发油计）。

2.4.2 超滤离心法

（1）空白脂质体截留率考察：精密移取 200 μ L 空白脂质体溶液于 3 kD 超滤离心管，13 000 r/min（离心半径 6.26 cm）离心 20 min，向超滤管中加入 200 μ L 去离子水，重复洗涤 2 次，参数同上。收集上层脂质体溶液并用纯净水定容至 1 mL，取 200 μ L 于 96 孔板。以纯净水为对照，采用酶标仪于 500 nm^[14]处测定超滤后 A 值（ A_1 ）；另外精密移取 200 μ L 空白脂质体溶液，用纯净水直接定容至 1 mL，测定超滤前 A 值（ A_0 ），脂质体截留率= A_1/A_0 。空白脂质体截留率达（95.33 $\pm$ 0.24）%（ $n=3$ ），表明超滤膜在该参数下基本能够完全截留脂质体。

（2）游离药物回收率考察：分别移取 200 μ L 高、中、低 3 个不同质量浓度的混合对照溶液于 3 kD 超滤离心管中，13 000 r/min（离心半径 6.26 cm）离心 20 min，向超滤管中加入 200 μ L 纯净水，13 000 r/min（离心半径 6.26 cm）离心 20 min，重复 2 次。收集下层溶液，用甲醇稀释一定倍数，测定不同组

分超滤后质量浓度，记为 C_1 ；另外精密移取 200 μ L 混合对照溶液，甲醇直接稀释后测定不同组分超滤前质量浓度，记为 C_0 ，计算不同组分回收率，回收率= C_1/C_0 。结果显示，除甘草苷外，挥发油及其他组分的回收率均较低（表 1），表明超滤膜对此部分游离药物的吸附率高，且平行性差。

表 1 混合对照溶液超滤后不同组分的回收率考察（ $\bar{x} \pm s$ ， $n=3$ ）

Table 1 Recovery examination of different components after ultrafiltration ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

质量浓度/ (mg·mL ⁻¹)	挥发油	甘草酸	姜黄素	甘草苷
1.384	39.66 $\pm$ 4.02	97.67 $\pm$ 43.00	37.83 $\pm$ 8.79	152.91 $\pm$ 13.73
0.830	14.98 $\pm$ 4.65	1.20 $\pm$ 2.08	11.05 $\pm$ 0.85	121.13 $\pm$ 2.75
0.519	21.38 $\pm$ 6.30	2.72 $\pm$ 4.71	4.42 $\pm$ 0.70	99.28 $\pm$ 11.46

2.4.3 葡聚糖凝胶柱法

（1）凝胶柱准备：取葡聚糖凝胶（Sephadex G-50）干粉适量，纯净水溶胀 24 h。取底部装有筛板的玻璃柱（1.5 cm $\times$ 35 cm），将柱垂直安装好，先加入 1/3 柱体积 20%乙醇，接着将溶胀好的凝胶边搅匀边连续装入，使它们在柱内自然沉降。以 20%乙醇不断冲洗使柱子装紧，装柱后的凝胶必须均匀，不能有气泡或明显条纹^[4]。以 20%乙醇为洗脱剂，控制体积流量为 1.0 mL/min^[15]。

（2）洗脱曲线绘制：首先把柱内凝胶上面多余的洗脱剂放出，直到柱内液面与凝胶表面相齐，取 200 μ L BM-Lip/混合对照溶液（挥发油质量浓度为 0.830 mg/mL）上柱，以 20%乙醇为洗脱液，以每份 2 mL 接取样品，样品用等体积甲醇稀释。以第 1 管样品为对照，在 235 nm 处测定每份样品的 A 值，以体积对 A 值绘制挥发油的洗脱曲线^[15-18]。结果如图 3 所示，2 种不同径高比下脂质体与游离挥发油流出的间隔时间短，难以改善。

2.4.4 鱼精蛋白凝聚法

（1）不同影响因素对空白脂质体的凝聚作用：实验组中向 EP 管中加入 200 μ L 空白脂质体和 1~3 倍体积鱼精蛋白水溶液（10 mg/mL），涡旋 1 min，静置 3 min，加纯净水补至 800 μ L，4 $^{\circ}$ C 下离心 60 min，在一定转速下离心，取 200 μ L 上清液用酶标仪测定其 500 nm 处 A 值（ A_1 ）；对照组中依次向 EP 管中加入 200 μ L 空白脂质体、600 μ L 纯净水，测定 A 值（ A_0 ），凝聚度= $(A_0-A_1)/A_0$ ^[19]，分别考察鱼精蛋白来源、蛋白加入量、转速对鱼精蛋白凝聚效

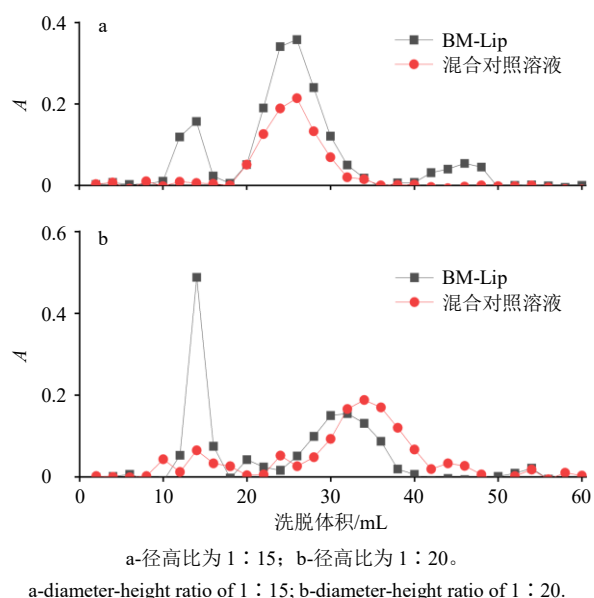


图 3 不同径高比下挥发油的洗脱曲线

Fig. 3 Elution profiles of volatile oils at different diameter-height ratios

果的影响。

不同来源鱼精蛋白的影响: 固定加入量为 1 倍, 以纯净水为溶剂配制 3 种不同来源的鱼精蛋白水溶液, 于 13 000 r/min (离心半径 6.26 cm) 下离心, 测定 Sigma 鱼精蛋白、鱼精蛋白注射液、中检院鱼精蛋白对空白脂质体的凝聚度分别为 $(83.99 \pm 1.69)\%$ 、 $(84.55 \pm 1.21)\%$ 、 $(86.59 \pm 0.51)\%$ ($n=3$), 三者间无显著性差异, 表明蛋白来源不是影响凝聚度的关键因素。

不同蛋白加入量对凝聚度的影响: 分别向空白脂质体中加入 1~3 倍量 Sigma 来源的鱼精蛋白水溶液, 于 13 000 r/min (离心半径 6.26 cm) 下离心, 测定 1、2、3 倍量鱼精蛋白对空白脂质体的凝聚度分别为 $(82.45 \pm 0.33)\%$ 、 $(82.01 \pm 0.19)\%$ 、 $(80.14 \pm 0.37)\%$ ($n=3$), 三者间无显著性差异, 表明鱼精蛋白不同加入量对脂质体凝聚度无明显影响。

不同转速对凝聚度的影响: 向空白脂质体中加入等体积 Sigma 来源的鱼精蛋白水溶液, 测试不同离心转速对凝聚度的影响。在 8 000、13 000、17 000 r/min (离心半径 6.26 cm) 转速下, 鱼精蛋白对空白脂质体的凝聚度分别为 $(75.08 \pm 2.62)\%$ 、 $(85.01 \pm 0.49)\%$ 、 $(90.01 \pm 0.56)\%$ ($n=3$), 可见, 离心转速对凝聚度影响较大, 在普通高速离心机极限条件 17 000 r/min 下, 其凝聚度达到 90.01%, 故后续采用 17 000 r/min 条件进行加样回收率考察。

(2) 对游离药物的回收率考察: 实验组中, 分

别移取 200 μL 低、中、高 3 个不同质量浓度的混合对照溶液于 1.5 mL 离心管中, 加入 200 μL Sigma 鱼精蛋白水溶液 (10 mg/mL), 涡旋 1 min, 静置 3 min, 补充纯净水至 800 μL , 4 $^{\circ}\text{C}$ 、17 000 r/min (离心半径 6.26 cm) 条件下离心 60 min。取上清液进行 HPLC 分析, 测定不同组分质量浓度 (C_1); 对照组中, 分别移取 80 μL 不同质量浓度混合对照溶液、120 μL 空白脂质体溶液于 1.5 mL 离心管中, 直接加入 600 μL 甲醇, 测定不同组分质量浓度 (C_0), 回收率 = C_1/C_0 。鱼精蛋白本身干扰挥发油及甘草酸的定量, 故仅测定甘草苷、姜黄素的回收率。计算得低、中、高质量浓度混合对照溶液中, 甘草苷的平均回收率分别为 132.57%、126.61%、126.09%, RSD 分别为 1.88%、2.43%、2.24%, 姜黄素的平均回收率分别为 71.95%、57.31%、39.43%, RSD 分别为 3.15%、2.42%、3.57%。结果显示, 鱼精蛋白可增加甘草苷在 237 nm 处的吸收, 使得不同质量浓度下回收率均大于 100%。另外, 鱼精蛋白与姜黄素存在一定反应^[20-21], 使得姜黄素回收率偏低, 且姜黄素质量浓度越高二者作用越强。

(3) 对空白脂质体与游离药物的物理混合物加样回收率考察: 实验组中, 分别移取 80 μL 低、中、高 3 个不同质量浓度的混合对照溶液、120 μL 空白脂质体溶液于 1.5 mL 离心管中, 加入 200 μL Sigma 鱼精蛋白水溶液 (10 mg/mL), 涡旋 1 min, 静置 3 min, 补充纯净水至 800 μL , 4 $^{\circ}\text{C}$ 、17 000 r/min (离心半径 6.26 cm) 条件下离心 60 min。取上清液进行 HPLC 分析, 测定不同组分质量浓度 (C_1); 对照组中, 分别移取 80 μL 不同质量浓度混合对照溶液、120 μL 空白脂质体溶液于 1.5 mL 离心管中, 直接加入 600 μL 甲醇并超声破乳 10 min, 测定不同组分质量浓度 (C_0), 加样回收率 = C_1/C_0 。计算得低、中、高质量浓度混合对照溶液与空白脂质体的物理混合物中, 甘草苷的平均加样回收率分别为 98.67%、102.38%、104.88%, RSD 分别为 3.44%、4.07%、1.55%, 姜黄素的平均加样回收率分别为 18.94%、21.98%、22.96%, RSD 分别为 2.58%、3.87%、1.20%。结果显示, 甘草苷及姜黄素的加样回收率较回收率均有所降低, 说明鱼精蛋白与脂质体的凝聚物对游离药物可能存在一定程度的吸附。

2.4.5 超速离心法

(1) 对空白脂质体沉淀作用: 移取适量空白脂质体置于离心管中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 40 000 r/min (离心

半径 4.73 cm) 超速离心 60 min, 取上清液 200 μ L 用酶标仪于 500 nm 处测定其 A 值 (A_1); 对照组中, 精密吸取 200 μ L 空白脂质体, 用酶标仪于 500 nm 处测定其 A 值 (A_0), 沉淀率 $= (A_0 - A_1) / A_0$ 。计算得超速离心对空白脂质体的沉淀率为 98.49%, RSD 为 0.01% ($n=3$), 基本将空白脂质体全部沉淀下来。

(2) 不同组分回收率考察: 分别移取适量低、中、高 3 个不同质量浓度的混合对照溶液置于离心管中, 4 $^{\circ}$ C 条件下 40 000 r/min (离心半径 4.73 cm) 超速离心 60 min, 取 250 μ L 上清液, 用甲醇稀释 4 倍后, 测定上清液中各成分质量浓度, 甲醇进一步稀释后测定挥发油质量浓度, 离心后质量浓度记为 (C_1); 在对照组中, 分别移取 250 μ L 低、中、高 3 个质量浓度的混合对照溶液用无水甲醇稀释 4 倍, 测定不同成分质量浓度, 甲醇进一步稀释后测定挥发油质量浓度, 离心前质量浓度记为 (C_0), 计算不同组分回收率, 回收率 $= C_1 / C_0$ 。计算得低、中、高质量浓度混合对照溶液中, 挥发油的平均回收率分别为 96.29%、98.04%、101.95%, RSD 分别为 2.52%、1.41%、0.95%; 甘草苷的平均回收率分别为 99.21%、98.38%、98.44%, RSD 分别为 1.18%、0.41%、1.00%; 甘草酸的平均回收率分别为 96.91%、97.14%、98.00%, RSD 分别为 1.42%、1.96%、1.26%; 姜黄素的平均回收率分别为 99.30%、98.01%、98.52%, RSD 分别为 0.82%、1.85%、1.60%。

(3) 对空白脂质体与游离药物的物理混合物加样回收率考察: 按 2:3 体积比分别移取低、中、高 3 个不同质量浓度的混合对照溶液、空白脂质体溶液进行混合, 得到不同质量浓度的物理混合对照溶液。实验组中, 分别移取适量不同质量浓度的物理混合对照溶液置于离心管中, 4 $^{\circ}$ C 条件下 40 000 r/min (离心半径 4.73 cm) 超速离心 60 min。取 250 μ L 上清液, 用甲醇稀释 4 倍后, 测定上清液中各成分质量浓度, 甲醇进一步稀释后测定挥发油质量浓度, 离心后质量浓度记为 C_1 ; 对照组中, 分别移取 250 μ L 不同质量浓度物理混合对照溶液, 用无水甲醇稀释 4 倍, 测定不同成分质量浓度, 甲醇进一步稀释后测定挥发油质量浓度, 离心前质量浓度记为 C_0 , 计算不同组分加样回收率, 加样回收率 $= C_1 / C_0$ 。计算得低、中、高质量浓度的混合对照溶液与空白脂质体的物理混合对照溶液中, 挥发油的平均加样回收率分别为 80.22%、81.85%、85.26%, RSD 分别为 1.19%、0.63%、0.71%; 甘草苷的平均加样回

收率分别为 106.10%、101.36%、103.46%, RSD 分别为 2.48%、2.76%、1.00%; 甘草酸的平均加样回收率分别为 103.47%、101.86%、103.18%, RSD 分别为 1.45%、2.70%、0.80%; 姜黄素的平均加样回收率分别为 100.34%、97.35%、99.65%, RSD 分别为 1.63%、1.57%、1.07%。结果显示, 通过对离心后的沉淀洗涤后再次离心, 排除了沉淀对游离药物的吸附作用, 猜测二者在物理混合后就完成了部分游离药物的自组装, 尤其是极性非常小的挥发油。

2.5 BM-Lip 包封率测定

移取适量 BM-Lip 置于离心管中, 4 $^{\circ}$ C 条件下 40 000 r/min (离心半径 4.73 cm) 超速离心 60 min, 取 250 μ L 上清液用甲醇稀释 4 倍后测定上清液中各成分质量浓度, 甲醇进一步稀释后测定挥发油质量浓度, 离心后质量浓度记为 C_1 ; 在对照组中, 移取 250 μ L BM-Lip 用无水甲醇稀释 4 倍, 测定不同成分质量浓度, 甲醇进一步稀释后测定挥发油质量浓度, 离心前质量浓度记为 C_0 , 计算不同组分包封率, 包封率 $= (1 - C_1 / C_0)$ 。平行制备 3 组 BM-Lip, 测得挥发油包封率达 $(76.15 \pm 0.16) \%$, 甘草苷、甘草酸和姜黄素包封率分别为 $(10.15 \pm 1.41) \%$ 、 $(7.09 \pm 0.57) \%$ 和 $(84.08 \pm 1.03) \%$ 。

3 讨论

脂质体能够同时负载亲水性和疏水性物质, 具有良好的生物相容性、靶向性且能延长药效^[22], 可以克服传统的中药经皮制剂存在的渗透效果差、皮肤滞留能力差、用药范围局限等缺陷^[23], 目前已成为中药剂型改良的研究热点之一。尤其对于所含活性成分性质复杂的中药经皮复方制剂而言, 脂质体有望实现其复杂成分的良好共载和有效经皮递送。

为确保中药复方的整体功效性, 在应用脂质体材料时, 对于脂质体包封率的准确测定是中药复方脂质体制备工艺优化和质量控制过程的一个关键环节。然而, 由于影响包封率测定的因素众多以及所负载成分性质的复杂性, 测定多组分共载的中药复方脂质体的包封率一直是其制备过程中的一大难题, 因而成为限制其发展的重要因素。故目前国内虽已有不少针对 2 种药物成分共载的脂质体制剂的研究^[24-26], 却罕见同时包载 3 种及以上性质差异较大的成分的中药复方多组分共载脂质体的相关研究报道。

在脂质体包封率测定过程中, 首要任务是针对各待测组分建立专门的定量方法。值得注意的是,

中药挥发油作为一种复杂的化学成分混合物,若仅针对单一成分进行定量,难以全面反映其整体质量,且常面临对照品匮乏的问题。紫外-可见分光光度法因其能够测定在紫外-可见光谱区具有吸收的挥发油个别成分含量或总含量,而被广泛应用于此类分析^[27]。

基于前期研究,发现白脉复方挥发油中的多数成分含有 α 、 β 不饱和羰基及苯环等共轭结构,这些结构在紫外波长下具有特征性的选择性吸收,因此,本研究采用紫外-可见分光光度法对白脉复方挥发油进行定量测定。此外,对于水溶性成分甘草苷、甘草酸以及脂溶性成分姜黄素,均采用 HPLC 法进行定量测定^[28-30]。方法学考察结果表明,本研究所建立的各定量测定方法准确、可靠,可基于此进行后续脂质体包封率的测定。

在测定包封率时,实现脂质体与游离药物的有效分离是关键。本研究分别采用了超滤离心法、葡聚糖凝胶柱法、鱼精蛋白凝聚法及超速离心法 4 种方法来分离脂质体与游离药物,上述方法各有优劣。超滤离心法多用于测定水溶性药物脂质体的包封率,具有操作简单、分离时间短、所需样品量少、不必稀释样品而可避免相应的药物渗漏等优点,但所耗成本较高。该法在应用时需同时确保以下 2 点:超滤膜能够完全截留脂质体和游离药物能够完全通过超滤膜。然而,尽管前期根据被分离物质的相对分子质量选择了合适规格的超滤膜,部分药物仍可能因“浓差极化”效应而被吸附在超滤膜上,造成损失,从而影响测定结果的准确性^[8]。在实际操作中发现,BM-Lip 虽能被超滤膜完全截留,但超滤膜对白脉复方中的部分药物(尤其是脂溶性成分)可能具有较强的吸附作用而导致其回收率较低,且测得甘草苷的回收率明显过高,这些结果表明超滤离心法不适用于 BM-Lip 包封率测定。

葡聚糖凝胶柱法则广泛用于脂质体包封率测定,具有成本低、对设备要求不高等优点,但其操作相对繁琐、耗时较长,且分离过程中对样品的稀释程度较大,从而可能引起脂质体内药物渗漏。该方法基于“分子筛”和吸附双重作用的原理,其分离效果与被分离组分性质密切相关,且容易受上样量、洗脱剂、洗脱体积流量、径高比等影响^[31]。本实验前期确定了以 20%乙醇为洗脱剂时,各组分洗脱效果良好,且脂质体的完整形态未受影响^[16]。但在进行径高比考察时发现,无论径高比如何改变,

脂质体与游离挥发油分离效果均较差而不利于收集,故也不宜采用此法进行 BM-Lip 包封率测定。

而鱼精蛋白凝聚法操作简单、分离效率高,且适用于测定不同溶解性质药物脂质体的包封率。通过前期测定 BM-Lip 的 ζ 电位,得知其带负电荷,而鱼精蛋白带正电,适用于带负电或电中性脂质体的分离。需要注意的是,鱼精蛋白在遇到破乳剂中的某些成分(如甲醇等)时易发生变性^[32],进而影响药物定量结果,故在应用鱼精蛋白凝聚法时,需确保鱼精蛋白能够将脂质体完全沉淀下来,以避免在后续加入破乳剂时产生干扰。然而,影响鱼精蛋白对脂质体凝聚效果的因素较多,例如脂质体浓度、蛋白来源和加入量等^[33],故本研究对这些因素进行了系统性考察,结果表明鱼精蛋白来源和加入量对 BM-Lip 的凝聚度并未产生显著影响,而转速则对凝聚度影响较大。故本研究中采用了普通离心机所能达到的最高转速,以获得鱼精蛋白与空白脂质体的最高凝聚度。然而,用此法对各成分进行回收率考察的结果较差,表明鱼精蛋白凝聚法也不适用于 BM-Lip 包封率测定。

超速离心法要求离心转速大于 20 000 r/min,离心时间一般要长于 30 min,这不仅对仪器设备有较高要求,而且需要脂质体膜结构具备一定的硬度,以承受高转速带来的影响^[7]。鉴于 BM-Lip 中包载的主要成分白脉复方挥发油属于轻油,故需采用较高的离心转速方能满足脂质体沉淀的要求。在采用该法进行分离时,测定空白脂质体沉淀率、游离药物回收率及不同组分加样回收率时,均表现出较好的结果。值得注意的是,当空白脂质体与游离药物混合时,部分药物(特别是本研究中涉及的挥发油及脂溶性成分姜黄素)与脂质体物理混合时可能会发生自组装现象,导致其加样回收率无法达到 100%。因本研究中已证明脂质体对游离药物基本无吸附性,故只要空白脂质体凝聚度及混合对照溶液中各组分的回收率合格,即可证明该分离方法适用于脂质体与游离药物的分离。这一现象提示,同一分离方法及评价指标并非适用于所有研究,而是需要根据具体成分性质进行判断和考虑。本研究采用超速离心法成功地将脂质体与游离药物分离,并且该方法也适用于本实验中入药的挥发油及多种极性成分。

综上所述,本实验建立了 BM-Lip 中挥发油、甘草苷、甘草酸及姜黄素 4 种代表性组分的定量检

测方法,通过对超滤离心法、葡聚糖凝胶柱法、鱼精蛋白凝聚法及超速离心法 4 种分离手段的考察、比较,确立了适用于白脉复方多组分共载脂质体的包封率测定法,具体参数设置如下:在 4 ℃ 条件下,以 40 000 r/min 的转速离心 60 min。依据此方法测得挥发油的包封率达 $(76.15 \pm 0.16) \%$,甘草苷、甘草酸及姜黄素的包封率分别为 $(10.15 \pm 1.41) \%$ 、 $(7.09 \pm 0.57) \%$ 和 $(84.08 \pm 1.03) \%$ 。通过包封率结果可知,本课题所用的 BM-Lip 中部分药物的包封率较低,因此,后续研究将基于此包封率测定法,对 BM-Lip 的制备过程进行系统优化,以综合提高其包封率,为该制剂的质量表征与评价及其后续的药效学评价提供必要基础。本研究也可为相关的含挥发油及不同极性成分的多组分共载的中药复方脂质体包封率的测定提供有益参考和依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 范佳佳,李鑫,孙洪昊,等.基于藏族医学理论的白脉病内涵挖掘及白脉软膏组方用法分析[J].中国中药杂志,2022,47(5):1409-1414.
- [2] Cheruvu H S, Liu X, Grice J E, et al. Modeling percutaneous absorption for successful drug discovery and development [J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2020, 15(10): 1181-1198.
- [3] 梁军,武慧超,杜守颖,等.白脉软膏主要成分体外经皮透过性的研究[J].中国中药杂志,2019,44(12):2486-2492.
- [4] 代旭栋,李云,李双双,等.皮肤外用脂质体的研究进展[J].国际药学研究杂志,2020,47(11):914-921.
- [5] Van Tran V, Moon J Y, Lee Y C. Liposomes for delivery of antioxidants in cosmeceuticals: Challenges and development strategies [J]. *J Control Release*, 2019, 300: 114-140.
- [6] 王兆宇,杜茂波,谷丽维,等.中药皮肤靶向纳米制剂的研究进展[J].中草药,2024,55(21):7557-7566.
- [7] 张艺,杭太俊,宋敏.载药脂质体包封率测定方法的研究进展[J].中国药科大学学报,2021,52(2):245-252.
- [8] Ran C C, Chen D, Xu M, et al. A study on characteristic of different sample pretreatment methods to evaluate the entrapment efficiency of liposomes [J]. *J Chromatogr B*, 2016, 1028: 56-62.
- [9] 肖五庆,梁军,竺榭银,等.微针对白脉软膏经皮渗透性及应用安全性研究[J].中草药,2023,54(6):1766-1774.
- [10] 竺榭银,梁军,肖五庆,等.化学促透剂丙二醇及超声促透技术对白脉软膏经皮渗透性的影响研究[J].中国中药杂志,2022,47(24):6607-6614.
- [11] 梁军,刘彩凤,刘冬涵,等.藏药白脉软膏多成分定量、指纹图谱结合多元统计分析的质量控制研究[J].中草药,2020,51(2):356-363.
- [12] 中国药典[S].一部.2020:88-89.
- [13] 潘文丽,张冰,何海冰,等.Box-Behnken 设计-响应面法优化西洋参茎叶皂苷口服脂质体处方[J].沈阳药科大学学报,2020,37(12):1057-1065.
- [14] 马宁辉,路璐,丁越,等.盐酸阿霉素和知母皂苷 AIII 共载脂质体的制备及包封率的测定[J].中草药,2019,50(1):69-75.
- [15] 张晓蕾,乔红群,刘晶.复方盐酸伊立替康和氟尿嘧啶脂质体注射液包封率测定方法研究[J].中国现代应用药学,2021,38(13):1588-1593.
- [16] 管咏梅,刘佳,张建林,等.解郁安神方中 4 种混合挥发油脂质体的制备与评价[J].中国中药杂志,2019,44(7):1363-1370.
- [17] 刘卫斌,薛彦宁,秦永刚.鱼精蛋白凝聚法测定和厚朴酚脂质体的包封率[J].中国药房,2010,21(39):3695-3697.
- [18] 张佳佳,朱源,余江南,等.辛香料挥发油类化学成分的新型载体系统研究进展[J].中国中药杂志,2015,40(20):3932-3936.
- [19] 杨硕晔,王杏林,杨志强.洛莫司汀-碘海醇复方脂质体的制备及包封率测定[J].中国药房,2014,25(1):48-51.
- [20] Potter R, Truelstrup Hansen L, Gill T A. Inhibition of foodborne bacteria by native and modified protamine: Importance of electrostatic interactions [J]. *Int J Food Microbiol*, 2005, 103(1): 23-34.
- [21] 尹立冲.姜黄素的提纯、性质及其应用的研究[D].长春:吉林大学,2014.
- [22] Dymek M, Sikora E. Liposomes as biocompatible and smart delivery systems—the current state [J]. *Adv Colloid Interface Sci*, 2022, 309: 102757.
- [23] Li J, Wang X L, Zhang T, et al. A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems [J]. *Asian J Pharm Sci*, 2015, 10(2): 81-98.
- [24] Caliskan Y, Dalgic A D, Gerekci S, et al. A new therapeutic combination for osteosarcoma: Gemcitabine and Clofazimine co-loaded liposomal formulation [J]. *Int J Pharm*, 2019, 557: 97-104.
- [25] Ahmed K S, Shan X T, Mao J, et al. Derma roller® microneedles-mediated transdermal delivery of doxorubicin and celecoxib co-loaded liposomes for enhancing the anticancer effect [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2019, 99: 1448-1458.
- [26] 丁欢欢,姜先梅,刘红梅,等.藤黄酸和雷帕霉素共载

- 脂质体的制备及协同抗肿瘤活性研究 [J]. 中草药, 2024, 55(9): 2896-2911.
- [27] 焦姣姣, 王雅琪, 熊优, 等. 2015 年版《中国药典》一部含挥发油类中药的分类及其质量影响因素分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(9): 197-206.
- [28] Tian M L, Yan H Y, Ho Row K. Extraction and analysis of liquiritin from licorice [J]. *J Liq Chromatogr Relat Technol*, 2009, 32(7): 964-970.
- [29] 陈玲玲, 王洪云, 何晓山, 等. HPLC 法定量脑康泰胶囊中 7 个成分含量 [J]. 中药材, 2024, 47(4): 952-956.
- [30] Bi W T, Tian M L, Row K H. Solid-phase extraction of liquiritin and glycyrrhizin from licorice using porous alkyl-pyridinium polymer sorbent [J]. *Phytochem Anal*, 2010, 21(5): 496-501.
- [31] 朱玉洁. 葡聚糖凝胶柱层析富集黑果枸杞总花色苷工艺及其抗氧化性研究 [J]. 食品研究与开发, 2020, 41(7): 12-18.
- [32] 饶丹华. 鲟鱼精蛋白与多肽的分离纯化及性质研究 [D]. 武汉: 武汉工程大学, 2017.
- [33] 付丽娜, 李伟泽, 赵宁, 等. HPLC 法测定黄藤素纳米柔性脂质体的含量及包封率 [J]. 西北药学杂志, 2019, 34(1): 80-83.

[责任编辑 郑礼胜]