

医药与日化原料

高纯竹叶碳苷黄酮复合纳米材料的制备及结构

张宇靖, 赵镇雷, 韩建欣, 张英*

(浙江大学 生物系统工程与食品科学学院, 浙江省农产品加工技术研究重点实验室,
浙江省食品加工技术与装备工程研究中心, 浙江 杭州 310058)

摘要: 采用离子交联法, 以高纯竹叶碳苷黄酮制剂(碳苷总质量分数>90%, 记为 H -BLF)和芜根阴离子多糖(TP)为原料, 通过 ϵ -聚赖氨酸(ϵ -PL)的阳离子桥键合制备了竹叶碳苷黄酮纳米混悬液(H -BLFnd), 然后在混悬液中添加质量分数8%的 γ -环糊精, 经真空冷冻干燥得到纳米冻干粉(H -BLFnp), 采用粒径分析、TEM、UV、FTIR、TG和DSC对其外观、性能、结构进行了表征。结果表明, H -BLFnp外观为白色粉状, 表面光洁平整, 色泽均匀, 平均粒径为(679±10.2)nm, 分散系数为0.349±0.004, 包埋率为92.39%±0.34%。
关键词: 高纯竹叶碳苷黄酮; 复合纳米材料; 粉末化制剂; 护肤功能因子; 水感型化妆品; 日化原料
中图分类号: TQ658 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5214(2019)02-0283-05

Preparation and Structural Characterization of the Nanomaterials Taking High Purity C-glycoside Flavonoids of Bamboo Leaf as Leading Material

ZHANG Yu-jing, ZHAO Zhen-lei, HAN Jian-xin, ZHANG Ying*

(College of Biosystems Engineering and Food Science, Zhejiang University, Zhejiang Key Laboratory for Agro-Food Processing, Zhejiang R&D Center for Food Technology and Equipment, Hangzhou 310058, Zhejiang, China)

Abstract: The nanodrops (H -BLFnd) were prepared by ionic cross-linking method, taking high purity C-glycoside flavonoids of bamboo leaf (H -BLF, the mass fraction of C-glycoside flavonoids was above 90%) and turnip polysaccharide (TP) as raw materials, ϵ -polylysine as a cross-linking agent. Subsequently, adding 8% mass fraction of γ -cyclodextrin into H -BLFnd suspension as protective agent, nanoparticles (H -BLFnp) were obtained *via* vacuum freeze drying. The appearance, performance and structural characterization of H -BLFnp were characterized by particle size analysis, TEM, UV, FTIR, TG and DSC. The results showed that H -BLFnp was a kind of white powder, which had smooth surface and uniform color. The average particle size was (679±10.2) nm with a dispersion coefficient of 0.349±0.004. The encapsulation efficiency of H -BLFnp was 92.39%±0.34%.

Key words: high purity C-glycoside flavonoids of bamboo leaf; nanomaterial; powdered preparation; skin-protecting factor; water-sensitive cosmetics; cosmetic materials

Foundation item: National Program on Key Basic Research Project of China (2012CB720806)

竹叶黄酮(Bamboo Leaf Flavone, BLF)是一种源自竹叶酚性部位的“新食品原料”^[1], 具有抗氧化、抗自由基、抑菌等生物学功效^[2-5], 在护肤品领域具有巨大的潜在用途^[6-7]。竹叶黄酮主要功效成分为碳苷黄酮(C-glycoside flavones), 特征性化合物包括荭草苷、异荭草苷、牡荆苷、异牡荆苷^[8], 能抗热解和酶解, 遇酸不完全水解, 同时其强亲水性

有助于其在食品、药品和护肤品领域的应用^[9]。

目前, 竹叶黄酮在化妆品行业应用的主要瓶颈问题: 一是其固有的色泽(黄酮本身是一种植物黄色素); 二是商品制剂的精度不高。王楠^[10]等采用竹叶黄酮商品化制剂(碳苷黄酮总质量分数约为25%), 通过离子交联法得到的竹叶黄酮纳米混悬液能够起到与 β -熊果苷相同的美白效果。但该方法制

收稿日期: 2018-08-03; 定用日期: 2018-10-29; DOI: 10.13550/j.jxhg.20180577

基金项目: 国家重点基础研究发展规划(973计划)(2012CB720806)

作者简介: 张宇靖(1993—), 女, 硕士生。联系人: 张英(1961—), 女, 教授, 博士生导师, E-mail: yzhang@zju.edu.cn。

备的纳米材料通常以液态形式存在,不宜长期贮存,会出现沉降、聚集、降解等各种不稳定现象^[11-13]。可采用真空冷冻干燥法制成粉剂^[14],并加入适当的保护剂,以防纳米颗粒团聚^[15]。 γ -环糊精是一种新型商业化制剂,具有环状中空的立体结构,能对目标物进行有效包裹,实现单层纳米材料向多层纳米材料的转变,大大提高纳米材料的稳定性,同时防止芯材渗漏^[16],可作为冻干保护剂改善冻干粉的商品性,如提高溶解度、掩盖色泽、去除不良气味等^[17]。

本文在前期研究的基础上,采用高纯竹叶碳苷黄酮为原料,以获得具有更高包埋率和更强生物学效应的复合纳米生物混悬液,并通过 γ -环糊精的保护得到冻干粉,以期实现性能和剂型的双重优化。同时,对高纯竹叶碳苷黄酮复合纳米生物材料的外观、结构和性能进行表征,以期为日化行业提供一种成分天然、工艺绿色、产品安全,并同时具有保湿、美白、抗衰老等多重生物学功效的新型护肤功能因子。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

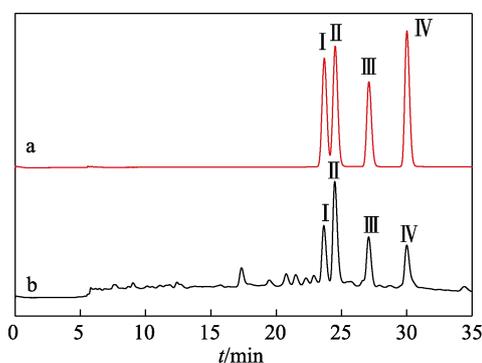
低纯度竹叶黄酮(L-BLF,硝酸铝-亚硝酸钠比色法测得总黄酮质量分数为49.5%,RP-HPLC法测得其4个碳苷质量分数为25.1%),浙江圣氏生物科技有限公司;芜根阴离子多糖(质量分数为94.6%),按照文献^[18]自制; ϵ -聚赖氨酸(ϵ -PL,质量分数为95%),化学纯,浙江银象生物工程有限公司;溴化钾(质量分数 \geq 99.5%),光谱纯,上海阿拉丁生化科技有限公司;甲醇,色谱纯,美国TEDIA公司;荭草苷、异荭草苷、牡荆苷、异牡荆苷标准品(质量分数 \geq 98%),成都普菲德生物技术有限公司;其他化学试剂均为市售分析纯。

Nano Zs90 纳米粒径及电位分析仪,英国 Malvern 公司;HL-2B 数显恒流泵,上海嘉鹏科技有限公司;2695 分析型高效液相色谱仪(配有 2998 PDA 检测器、Alliance 柱温箱、四元梯度泵等),美国 Waters 公司;RE-52AA 旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂;冷冻干燥机,德国 Christ 公司;Luna C₁₈ 柱(250 mm \times 4.60 mm \times 5 μ m),美国 Phenomenex 公司;JEM-1230 透射电子显微镜,日本 JEOL 电子株式会社;酶标仪,美国 BioTek 仪器有限公司;AVATAR370 傅里叶变换红外光谱仪,美国 Nicolet 公司;DSC1 差示扫描量热仪,瑞士梅特勒托利多公司;TGA 热重分析仪,美国 PE 公司;Milli-Q 超纯水仪,美国 Millipore 公司。

1.2 方法

1.2.1 高纯竹叶碳苷黄酮的制备

称取 1 g L-BLF 溶于 10 mL 温水中(水温 30~45 $^{\circ}$ C,常温下超声助溶),过滤后上聚酰胺柱(100~200 目),依次采用 2 倍柱体积的 20%、30%、40%、50%(体积分数)乙醇洗脱,收集 40%~50%(体积分数)的乙醇洗脱物,减压浓缩后上 C₁₈ 反相柱,依次用 15%、25%、30%、35%、40%、50%(体积分数)乙醇洗脱,经 RP-HPLC 检测[色谱条件为:ODS-C₁₈(250 mm \times 4.6 mm \times 5 μ m),流动相 V(甲醇):V(水)=3:7,检测波长 330 nm,流速 0.5 mL/min,柱温 40 $^{\circ}$ C]后,合并相同组分,减压浓缩除去乙醇,真空冷冻干燥得到高纯竹叶碳苷黄酮(H-BLF)备用。以异荭草苷、荭草苷、牡荆苷和异牡荆苷为标准品,高效液相色谱图见图 1。



I—异荭草苷; II—荭草苷; III—牡荆苷; IV—异牡荆苷
图 1 碳苷黄酮混标(a)和 H-BLF(b)的高效液相色谱图
Fig. 1 C-glycoside flavones (a) and H-BLF (b) by high performance liquid chromatography

如图 1 所示,测得 H-BLF 中 4 个碳苷总质量分数在 90%~98%,其中,异荭草苷、荭草苷、牡荆苷、异牡荆苷在混合物中的质量分数分别在 16%~17%、39%~41%、23%~24%、16%~17%。

1.2.2 H-BLF 复合纳米生物材料的制备

称取 2 mg H-BLF(RP-HPLC 法测得其质量分数为 95.6%)和 24 mg 芜根阴离子多糖(TP)溶于 8 mL 纯净水(30 $^{\circ}$ C)中,加热搅拌溶解,得到 H-BLF-TP 溶液。另将 0.8 mg ϵ -PL 溶于 2 mL 纯净水中,常温下搅拌至 ϵ -PL 完全溶解。在低速(300 r/min)磁力搅拌下,将 2 mL ϵ -PL 溶液通过恒流泵(流速为 300 mL/h)滴入 8 mL H-BLF-TP 溶液中,继续低速(300 r/min)磁力搅拌 30 min 后,得到 10 mL 高纯竹叶碳苷黄酮纳米混悬液(H-BLFnd)。

将 γ -环糊精(γ -CD)加入 H-BLFnd 中,使其质量分数分别为 2%、4%、6%、8%、10%,常温下搅拌至完全溶解,在超低温冰箱中(-80 $^{\circ}$ C)冷冻 24 h 后,于-50 $^{\circ}$ C、真空度 9~12 Pa 条件下冷冻干燥 48 h,得到高纯竹叶碳苷黄酮复合纳米生物材料(H-BLFnp),

以外观、色泽、复溶后外观、再分散性和平均粒径为指标, 采用 10 分制评分法考察不同 γ -CD 添加剂量对 H-BLFnp 品质的影响, 评分指标见表 1。

1.2.3 H-BLFnp 的碳苷黄酮包埋效果评价

采用 RP-HPLC 法测定 H-BLFnp 中 4 个碳苷质量。色谱条件同 1.2.1, 以甲醇 (A) / 水 (B) 为流动相, 梯度洗脱条件为 (体积分数) 28% A 与 72% B (0~24 min), 45% A 与 55% B (24~35 min)。

精密称取一定量荜苈草苷、异荜苈草苷、牡荆苷、异牡荆苷标准品, 配制混标溶液, 进样量 10 μ L; 采用峰面积归一化法绘制标准曲线。参考 Ruttala^[19] 等方法, 将 H-BLFnd 或复溶于适量超纯水中 (加热至 40 $^{\circ}$ C, 超声波辅助溶解) 的 H-BLFnp, 经高速

离心 (15000 r/min, 30 min) 后, 取上清液进样, 测定游离的 4 个碳苷质量。按下式计算包埋率 (η):

$$\eta / \% = \frac{(m_0 - m_1)}{m_0} \times 100 \quad (1)$$

式中, η 为包埋率, %; m_0 为样品中总的碳苷质量, mg; m_1 为样品中游离的碳苷质量, mg。

1.2.4 H-BLFnp 的外观及性能测定

紫外光谱: 波长范围 200~400 nm。FTIR: 采用溴化钾压片法对样品进行表征, 波数范围在 4000~400 cm^{-1} 。DSC: 升温速度 10 $^{\circ}$ C/min, 氮气流速为 30 mL/min, 扫描范围为 20~250 $^{\circ}$ C。TG: 升温速度 10 $^{\circ}$ C/min, 氮气气氛, 扫描范围为 30~600 $^{\circ}$ C。粒径测定: 采用粒径分析仪测定, 重复 3 次实验。

表 1 γ -CD 冻干保护效果的评价标准

Table 1 Evaluation index of freeze-drying protection effect by γ -CD

项目	评分			
	0~2	3~5	6~8	9~10
冻干品外观	皱缩、塌陷	针晶状, 表面略有皱缩、塌陷	略有针晶, 表面光洁平整	粉饼状, 表面光洁平整, 可整块脱离而不散落
色泽	黄色, 上下色差明显	白色, 上下略有色差	色泽均匀, 无花斑	色泽均匀, 无花斑, 质地细腻
复溶后外观	浑浊	略显浑浊	均匀	均匀半透明
再分散性	复溶时间 > 90 s	复溶时间为 60~90 s	复溶时间为 30~60 s	复溶时间 < 30 s

1.2.5 H-BLFnp 对皮肤和黏膜的刺激性评价

参考《化妆品安全技术规范 (2015 年版)》^[20] 的方法, 将 H-BLFnp 以 10% 质量分数复溶于纯净水中, 进行皮肤刺激性实验和急性眼刺激性实验。

1.2.6 数据分析

实验数据采用 Microsoft Excel 软件分析, 计算结果以平均值 \pm 标准差 (Mean \pm SD) 表示。

2 结果与讨论

2.1 γ -CD 添加量对冻干保护效果的影响

冻干前, 纳米材料的粒径为 (672 \pm 16.1) nm, 当 γ -CD 质量分数分别为 2%、4%、6%、8%、10% 时, 得到的纳米材料粒径分别为 (698 \pm 8.9)、(692 \pm 9.2)、(685 \pm 8.7)、(679 \pm 10.2)、(682 \pm 11.1) nm, γ -CD 质量分数为 8% 时, 粒径变化较小。

不同质量分数的 γ -CD 对 H-BLFnp 冻干保护效果的影响如表 2 所示。

如表 2 所示, 不添加 γ -CD 的冻干品外观、色泽、复溶后外观的评分低, 再分散性差 (复溶时间 > 90 s), 而添加 γ -CD 后, 试样的外观、色泽、复溶后外观和再分散性评分均有所提高, 这说明 γ -CD 能对纳米生物材料起到包裹保护、掩盖色泽、提高水溶性等作用。而当 γ -CD 质量分数为 8% 时, 冻干品外观、色泽、复溶后外观和再分散性的评分最高, 且与不添

加 γ -CD 时相比, 冻干前后粒径变化最小, 因此, 冻干保护剂 γ -CD 的质量分数可选择 8%。

表 2 不同质量分数 γ -CD 的冻干保护效果评价

Table 2 Evaluation on protective effect of freeze-drying with different γ -CD dosage

w (γ -CD) / %	冻干品外观	色泽	复溶后外观	再分散性
0	1	1	2	1
2	5	5	5	6
4	6	5	6	6
6	8	6	7	8
8	9	9	8	9
10	9	8	8	9

以质量分数 8% 的 γ -CD 为冻干保护剂, 冷冻干燥得到 H-BLFnp, 重复 3 次实验测得 H-BLFnp 的包埋率为 92.39% \pm 0.34%。

2.2 外观及性能

2.2.1 外观及粒径测定

复溶后的 H-BLFnp 粒径范围为 340~820 nm, 重复 3 次实验测得平均粒径为 (679.7 \pm 10.2) nm, 变异系数 CV 为 1.50%, 重复性较好, 分散系数 (PDI) 用于表示粒径分布的均一程度, PDI 越小表示粒径分布越均匀^[21], H-BLFnp 的 PDI 为 0.349 \pm 0.004, 说明 H-BLFnp 分布较为均一, 分散度良好。H-BLFnp 的透射电镜照片见图 2。

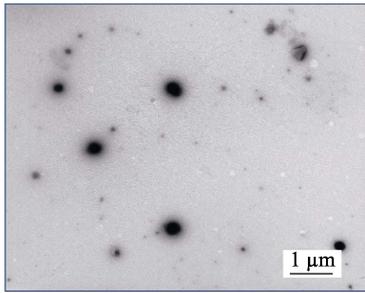
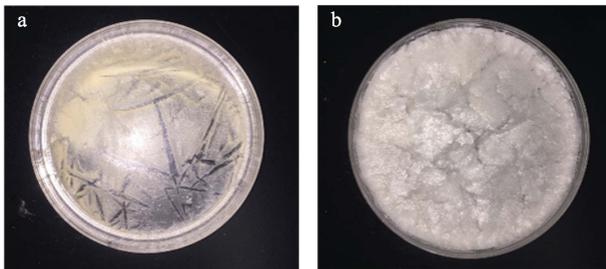


图 2 复溶后 H-BLFnp 的透射电镜照片
Fig. 2 TEM image of redissolution of H-BLFnp

如图 2 所示, H-BLFnp 的形态规则, 呈球形或类球形, 大小较均匀。H-BLFnp 的外观见图 3。



a—未加 γ -CD; b— $w(\gamma$ -CD)=8%

图 3 H-BLFnp 的外观
Fig. 3 Appearance of H-BLFnp

如图 3 所示, 不添加保护剂直接冻干得到的 H-BLFnp 呈现黄色色泽, 表面存在较多裂痕, 塌陷皱缩, 而 γ -CD 质量分数为 8% 时制备的 H-BLFnp 外观光洁平整, 呈粉饼状、色泽白色且均匀。

2.2.2 结构表征

H-BLF、H-BLFnd 和 H-BLFnp 的紫外最大吸收波长见表 3。

表 3 H-BLF、H-BLFnd 和 H-BLFnp 的紫外最大吸收波长
Table 3 UV wavelength of H-BLF、H-BLFnd and H-BLFnp

样品	λ_{max}/nm
H-BLF	270.0、336.7
H-BLFnd	270.0、337.9
H-BLFnp	270.0、336.7

如表 3 所示, 在 270 和 330 nm 附近, H-BLF、H-BLFnd 和 H-BLFnp 都出现了典型的竹叶碳苷黄酮的带 I 和带 II 吸收峰。

底物(H-BLF、 ϵ -PL、 γ -CD)、中间产物(H-BLFnd)及产物(H-BLFnp)的红外吸收光谱见图 4。

如图 4 所示, H-BLFnd 主要特征峰包括: 3405 cm^{-1} 的 O—H 伸缩振动峰, 2935 cm^{-1} 的 C—H 伸缩振动峰, 1658 cm^{-1} 为 ϵ -PL 中 C=O 伸缩振动峰(酰胺吸收带 I)位移吸收峰, 1583 cm^{-1} 为 ϵ -PL 中 N—H 弯曲与 C—N 伸缩振动耦合(酰胺吸收带 II)位移吸收峰, $1300\sim 1000\text{ cm}^{-1}$ 为单键伸缩和弯曲振动指纹区(如 1258 、 1103 和 1016 cm^{-1})。

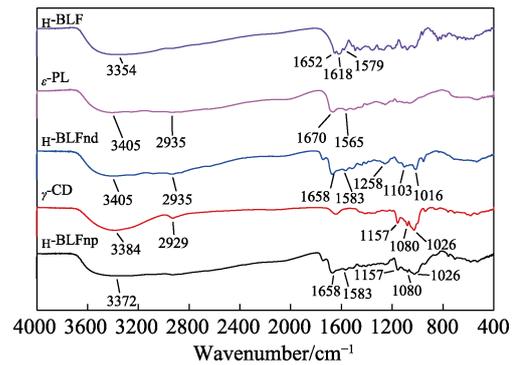


图 4 底物、H-BLFnd 及 H-BLFnp 的红外吸收光谱
Fig. 4 FTIR spectra of substrate、H-BLFnd and H-BLFnp

H-BLFnp 主要特征峰包括: 3372 cm^{-1} 的 O—H 伸缩振动峰, 1157 cm^{-1} 的 C—O—C 反对称伸缩振动峰, 以及 1658 和 1583 cm^{-1} 处 ϵ -PL 的特征吸收峰。同时, 还存在 γ -CD 的特征吸收峰(1157 、 1080 和 1026 cm^{-1}), 而对应于 H-BLFnd 的一些特征吸收峰强度明显降低, 单键伸缩振动和弯曲振动的指纹区域($1300\sim 1000\text{ cm}^{-1}$)也出现消失或较大位移, 如 1258 、 1103 和 1016 cm^{-1} 等, 这表明 γ -CD 与 H-BLFnd 主客体分子间发生了相互作用, H-BLFnd 进入 γ -CD 的空腔中, 形成了包合物。

H-BLFnd 和 H-BLFnp 的差示扫描量热分析结果如表 4 所示, TG 和 DSC 曲线如图 5、6 所示。

表 4 H-BLFnd 和 H-BLFnp 的差示扫描量热分析结果
Table 4 DSC results of H-BLFnd and H-BLFnp

样品	峰值温度/ $^{\circ}\text{C}$	热焓值 $\Delta H/(J/g)$
H-BLFnd	峰 I	89.55
	峰 II	208.15
H-BLFnp	峰 I	74.02
	峰 II	216.06

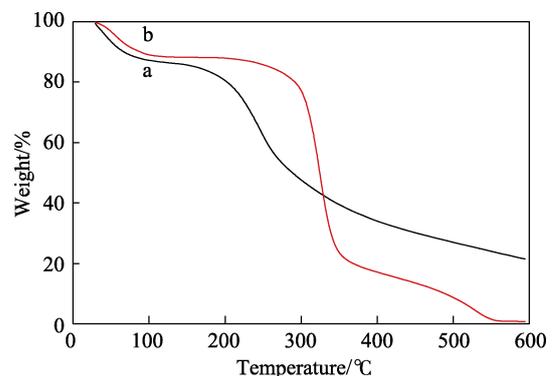


图 5 H-BLFnd (a) 和 H-BLFnp (b) 的 TG 曲线
Fig. 5 TG curves of H-BLFnd (a) and H-BLFnp (b)

如表 4 和图 5、6 所示, H-BLFnd 和 H-BLFnp 主要有两个吸热峰, 第一个吸热峰为失水峰, 第二个吸热峰为熔融峰^[22]。H-BLFnd 的熔融温度为 $208.15\text{ }^{\circ}\text{C}$, 热焓值为 14.27 J/g ; 而经 γ -CD 包裹后, H-BLFnp 的熔融温度提高至 $216.06\text{ }^{\circ}\text{C}$, 同时热焓值

提高至 52.63 J/g, 这表明 γ -CD 的包裹提高了纳米材料的熔融温度, 增加了热焓, 提高了纳米材料的稳定性。热重分析结果显示, H -BLFnd 与 H -BLFnp 在较低温度 (45~100 °C) 时出现由失水引起的失重, 与 DSC 结果一致。 H -BLFnd 在 246 °C 开始分解, H -BLFnp 在 324 °C 时开始分解, 分解温度的升高可能是由于 γ -CD 与 H -BLFnd 的相互作用引起的。

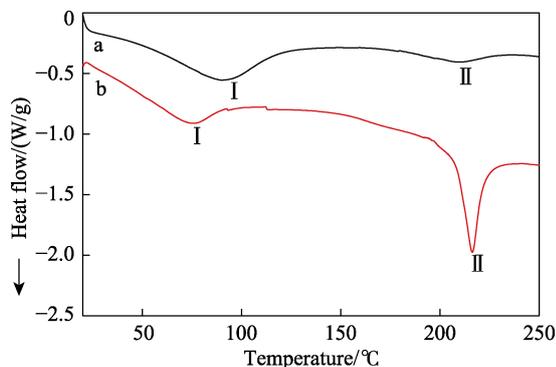


图6 H -BLFnd (a) 和 H -BLFnp (b) 的 DSC 曲线
Fig. 6 DSC curves of H -BLFnd (a) and H -BLFnp (b)

2.3 皮肤和黏膜刺激性评价

H -BLFnp 对小鼠的皮肤刺激性实验中, 每天每只动物皮肤刺激反应积分均值为 0, 属于无刺激性。 H -BLFnp 对小鼠的急性眼刺激性实验中, 眼膜、虹膜、结膜的刺激性最高积分均值均为 0。皮肤刺激性和眼刺激性实验表明, 在皮肤外用条件下, H -BLFnp 对皮肤及黏膜未产生刺激作用, 安全性高。

3 结论

与前期发表的竹叶黄酮纳米混悬液相比, 本文制备了 H -BLFnp, 将竹叶黄酮中 4 个碳苷的总质量分数从 25% 提高到 90% 以上, 并且黄酮的包埋率从原先的 40% 提高到 90% 以上。采用芫根阴离子多糖 (半乳糖醛酸质量分数 > 67%) 为壁材, 在改善制品色泽的同时, 提高了亲水性和皮肤的附着性, 适用于水感型产品。此材料有助于解决植物黄酮在化妆品应用中普遍存在的溶解度较低、产品色泽差、不易被皮肤吸收等问题, 同时提高了有效成分的稳定性、改善了分散性, 促进其在皮肤表层的渗透和吸收, 改进了护肤功效。在 γ -CD 的包裹和保护下, 通过冷冻干燥将纳米混悬液制备成粉末化制剂, 便于储存、运输和精确添加, 在日用化妆品, 尤其是水感型产品中具有良好的应用前景。

参考文献:

- [1] Zhang Ying (张英). Natural functional extract of bamboo leaves—bamboo leaf anthoxanthin[J]. China Food Additives (中国食品添加剂), 2002, 1(3): 54-58.
- [2] Lu B, Wu X, Tie X, et al. Toxicology and safety of anti-oxidant of bamboo leaves. Part I: Acute and subchronic toxicity studies on anti-oxidant of bamboo leaves[J]. Food and Chemical Toxicology, 2005, 43(5): 783-792.
- [3] Nirmala C, Bisht M S, Bajwa H K, et al. Bamboo: A rich source of natural antioxidants and its applications in the food and pharmaceutical industry[J]. Trends in Food Science & Technology, 2018, 77: 91-99.
- [4] Hu C, Zhang Y, Kitts D D. Evaluation of antioxidant and prooxidant activities of bamboo phyllostachys nigra var henonis leaf extract in vitro[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, 48(8): 3170-3176.
- [5] Zhang Ying (张英), Shen Jianfu (沈建福), Yu Zhuoyu (俞卓裕), et al. Primary studies on bamboo-leaf-flavonoids used as anti-aging factor for skin protection[J]. Chemistry and Industry of Forest Products (林产化学与工业), 2004, 24(1): 95-100.
- [6] Poonam S, Lalit M, Santosh S, et al. Bamboo shoots: A novel source of nutrition and medicine[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2011, 5(53): 517-534.
- [7] Wang Wenyuan (王文渊), Cai Min (蔡民), Li Yuting (李玉婷), et al. Study of efficacy of skin care cream formulated with flavonoids from bamboo leaves[J]. China Surfactant Detergent & Cosmetics (日用化学工业), 2011, 41(6): 430-433.
- [8] Zielińska D, Zieliński H. Antioxidant activity of flavone C-glycosides determined by updated analytical strategies[J]. Food Chemistry, 2011, 124(2): 672-678.
- [9] Gong Jinyan (龚金炎), Wu Xiaojin (吴晓琴), Zhang Ying (张英), et al. Advanced research of flavonoid C-glycosides and their pharmacological effects[J]. Natural Product Research and Development (天然产物研究与开发), 2010, 22(3): 525-530.
- [10] Wang Nan (王楠), Tang Weimin (唐伟敏), Chu Bingquan (楚秉泉), et al. Whitening efficacy of bamboo leaf flavonoids nanoparticles based on B16 melanoma cell evaluation system[J]. Fine Chemicals (精细化工), 2016, 33(12): 1375-1380.
- [11] Abdelwahed W, Degobert G, Stainmesse S, et al. Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2006, 58(15): 1688-1713.
- [12] Beirowski J, Inghelbrecht S, Arien A, et al. Freeze drying of nanosuspensions, 2: The role of the critical formulation temperature on stability of drug nanosuspensions and its practical implication on process design[J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2011, 100(10): 4471-4481.
- [13] Beirowski J, Inghelbrecht S, Arien A, et al. Freeze-drying of nanosuspensions 1: Freezing rate versus formulation design as critical factors to preserve the original particle size distribution[J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2011, 100(5): 1958-1968.
- [14] Beirowski J, Inghelbrecht S, Arien A, et al. Freeze-drying of nanosuspensions, part 3: Investigation of factors compromising storage stability of highly concentrated drug nanosuspensions[J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2012, 101(1): 354-362.
- [15] Zelenková T, Onnainty R, Granero G E, et al. Use of microreactors and freeze-drying in the manufacturing process of chitosan coated PCL nanoparticles[J]. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2018, 119(1): 135-146.
- [16] Valle E. Cyclodextrins and their uses: A review[J]. Process Biochemistry, 2004, 39(9): 1033-1046.
- [17] Zhang W, Ma J, Ren H, et al. Cyclodextrin inclusion technique and its application in food industry[J]. Food Industry, 2014, 35(9): 256-260.
- [18] Tang Weimin (唐伟敏). Comparative studies on chemical structure and anti-fatigue effect of polysaccharides both from Turnip (*Brassica rapa* L.) and Maca (*Lepidium meyenii* Walp.) [D]. Hangzhou: Zhejiang University (浙江大学), 2017.
- [19] Ruttala H B, Ramasamy T, Gupta B, et al. Multiple polysaccharide-drug complex-loaded liposomes: A unique strategy in drug loading and cancer targeting[J]. Carbohydrate Polymers, 2017, 173: 57-66.
- [20] General Administration of Food and Drug Administration of the People's Republic of China (中华人民共和国食品药品监督管理局). Safety technical specifications for cosmetics (2015 edition) [S]. Beijing: People's Medical Publishing House (人民卫生出版社), 2015: 490-495.
- [21] Rogosic M, Mencer H J, Gomzi Z. Polydispersity index and molecular weight distributions of polymers[J]. European Polymer Journal, 1996, 32(11): 1337-1344.
- [22] Liu Y, Liu D, Zhu L, et al. Temperature-dependent structure stability and in vitro release of chitosan-coated curcumin liposome[J]. Food Research International, 2015, 74: 97-105.