

医药与日化原料

越橘叶黄酮脂质体制备及对 HepG2 细胞的影响

成 圆^{1,2}, 丁 森^{1,2}, 王思宇^{1,2}, 樊梓鸾^{1,2*}

(1. 东北林业大学 生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150040; 2. 黑龙江省森林食品资源利用重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要: 对红豆越橘叶采用超声辅助提取和 AB-8 型大孔树脂纯化获得了黄酮含量高的馏分 (L6), 经 HPLC-MS 分析越橘叶黄酮为主要成分。以 L6 为芯材, 采用乙醇注入法制备了脂质体 L6-Lips, 经不同质量分数羧甲基壳聚糖 (CMCS) 水溶液修饰制备了 CMCS-L6-Lips。通过 FTIR、粒径分析、Zeta 电位和透析法对 CMCS-L6-Lips 进行了表征, 探究其在不同 pH 下体外释放能力及对 HepG2 细胞抑制能力。结果表明, L6 的黄酮含量可达 899.44 mg/g, 主要含有芦丁、槲皮素、槲皮素-3-O-葡萄糖醛酸苷、槲皮素 3-O-鼠李糖苷-7-O-葡萄糖苷、圣草酚-7-O-葡萄糖苷、儿茶素和绿原酸 7 种成分; CMCS 溶液质量分数与 CMCS-L6-Lips 粒径、包封率、Zeta 电位具有相关性。添加质量分数为 0.4% CMCS 水溶液时脂质体表面修饰效果最佳, 此时, Zeta 电位为 -35.65 mV, 表明 CMCS 成功附着在 L6-Lips 表面, 且 CMCS-L6-Lips 颗粒之间的排斥力明显更强, 稳定性更高。CMCS-L6-Lips 具有 pH 敏感性, 在 pH=4.0 时体外释放能力最高, 动力学方程符合 Weibull 模型, 为骨架溶蚀释放; CMCS-L6-Lips 可有效抑制 HepG2 细胞增殖, 减缓细胞迁移能力并阻滞细胞停留在 S 期和 G2 期。脂质体封装有效提高了越橘叶黄酮的溶解性, 使细胞对药物摄取的能力提升, 而 CMCS 的修饰增加了脂质体的靶向能力, 有利于治疗肿瘤。
关键词: 越橘叶; 黄酮; HPLC-MS; 脂质体; pH 敏感型; HepG2 细胞; 动力学方程; 活性跟踪法; 医药原料
中图分类号: TQ630; R285 文献标识码: A 文章编号: 1003-5214 (2024) 09-1996-10

Preparation of flavonoid liposomes from lingonberry leaves and their inhibitory effect on growth of HepG2 cells

CHENG Yuan^{1,2}, DING Miao^{1,2}, WANG Siyu^{1,2}, FAN Ziluan^{1,2*}

(1. College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, Heilongjiang, China; 2. Key Laboratory of Forest Food Resources Utilization of Heilongjiang Province, Harbin 150040, Heilongjiang, China)

Abstract: The highest flavonoid fraction (L6) in lingonberry leaves was obtained from ultrasound-assisted extraction and purification with AB-8 macroporous resin, with its main components analyzed by HPLC-MS. Carboxymethyl chitosan-L6-liposome (CMCS-L6-Lips) were then prepared from CMCS aqueous solution with different mass fraction modification of L6-liposomes, which were synthesized using L6 as core material via ethanol injection method, and characterized by FTIR, particle size analysis, Zeta potential and dialysis method. Its *in vitro* release ability at different pH and inhibitory ability on HepG2 cells were further analyzed and evaluated. The results showed that the flavonoid content of L6 could reach 899.44 mg/g, mainly containing 7 components such as rutin, quercetin, quercetin 3-O- β -D-glucuronide, quercetin 3-O-rhamnosid-7-O-glucoside, eriodictyol 7-O-glucoside, catechin and chlorogenic acid. The mass fraction of CMCS was correlated with the particle size, encapsulation rate, and Zeta potential of CMCS-L6-Lips. The surface modification effect of liposomes was optimal when 0.4% (mass fraction) CMCS solution was added, with a Zeta potential of -35.65 mV, indicating successful attachment of CMCS to the surface of L6-Lips and stronger repulsion forces between CMCS-L6-Lips particles, resulting in higher stability. The CMCS-L6-Lips exhibited pH sensitivity, with the

收稿日期: 2023-10-16; 定用日期: 2023-11-21; DOI: 10.13550/j.jxhg.20230866

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31170510); 黑龙江省自然科学基金联合引导项目 (LH2020C035); 中央高校基本科研业务费专项 (2572019BA09); 黑龙江省高等教育教学改革项目 (SJGY20200018); 中国博士后科学基金项目 (2016M600239)

作者简介: 成 圆 (1999—), 女, 硕士生, E-mail: cy_lyz1109@163.com。联系人: 樊梓鸾 (1981—), 女, 副教授, E-mail: fzl_1122@163.com。

highest *in vitro* release capacity at pH=4.0. The kinetic equation conformed to the Weibull model, indicating a skeleton erosion release mechanism. CMCS-L6-Lips could effectively inhibit the proliferation of HepG2 cells, slow down cell migration, and block cells from staying in the S and G2 phases. The encapsulation of liposomes effectively improved the solubility of lingonberry leaves flavonoid, enhancing the cell's ability to uptake the drug. Furthermore, the modification of CMCS increased the targeting ability of liposomes, which was beneficial for tumor treatment.

Key words: lingonberry leaves; flavonoids; HPLC-MS; liposomes; pH-sensitive type; HepG2 cells; kinetic equations; activity tracking method; drug materials

癌症是威胁人类生命健康的疾病之一,世界卫生组织统计,全球每年约有960万人死于癌症^[1]。目前,癌症的治疗手段主要包括手术、放疗和化疗。化疗是治疗转移性肿瘤的主要方法,但化疗有严重的副作用(如:骨髓抑制、神经毒性、胃肠道反应和肝肾损害等),还可诱导多药耐药,导致疾病复发^[2]。因此,从植物中提取天然化合物抑制癌细胞生长的研究成为人们的研究热点。黄酮是多酚化合物的主要亚群,已被证明具有抗氧化、抗菌、抗炎和抗癌等特性^[3]。越橘(*Vaccinium vitis-idaea* L.)是杜鹃花科的一种植物,其果实是一种天然浆果,富含抗氧化剂,如:维生素(C、A和E)、多酚和花色苷等,被誉为“超级水果”^[4]。其根茎叶中存在较多功能性成分,研究发现,越橘叶片中含有大量黄酮类成分^[5]。但黄酮的应用还存在许多问题,例如:水溶性低、稳定性差、胃肠道中渗透能力弱,而且黄酮在进入全身循环之前存在大量的首过效应影响人体吸收^[6]。因此,开发合适的黄酮载体对疾病治疗具有促进作用。

目前,载体系统主要包括乳剂、微胶囊、纳米结构脂质载体和脂质体,其中脂质体是由生物相容性材料组成的,安全性高,其独特的结构可提高材料的稳定性、吸收性和生物利用度,特别适用于递送不稳定生物活性物质^[7]。肿瘤微环境的细胞外pH为5.8~7.2,而溶酶体或内体的pH约为5.5,两者都比正常组织的pH(约7.4)低^[8]。因此,需要用pH敏感纳米载体提高癌症治疗的给药效率,这也是最常用的刺激响应型纳米材料之一。

本文拟研究越橘叶中黄酮的含量及其抗氧化能力,并对纯化后的黄酮进行HPLC-MS分析,然后以提取纯化后的越橘叶黄酮为内容物制备pH敏感型脂质体,通过体外释放实验验证其pH敏感性和释放机理,最后考察其对HepG2细胞增殖、迁移和细胞周期的影响。以期天然化合物抑制癌细胞生长和提高黄酮类化合物利用度提供新思路。

1 实验部分

1.1 材料、试剂与仪器

红豆越橘叶,绿色椭圆形叶片,当季采摘自大

兴安岭,储存于-20℃;芦丁标准品(质量分数≥99%)、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、2,2'-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS)、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、过硫酸钾、亚硝酸钠,AR,上海源叶生物科技有限公司;氢氧化钠、硝酸铝、二甲基亚砜(DMSO)、无水乙醇,AR,天津市天力化学有限公司;AB-8型大孔树脂、DMEM高糖培养基,美国Solaibio公司;胆固醇、羧甲基壳聚糖(CMCS),BR,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;大豆卵磷脂,AR,北京博奥拓达科技有限公司;胎牛血清,BR,浙江天航生物科技有限公司;噻唑兰(MTT),BR,南京建成生物工程研究所;细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒,上海碧云天生物科技有限公司。

EPOCH12型酶标仪,美国BioTek公司;KQ-300DE型数控超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;RE-200A型旋转蒸发器,巩义市予华仪器有限公司;QE Focus型超高效液相色谱-质谱联用仪、Nicolet iN10型傅里叶变换红外光谱仪,美国Thermo Fisher Scientific公司;CytoFlex型流式细胞仪,贝克曼库尔特商贸(中国)有限公司;Nano-ZS PALS激光粒度分析仪,英国Malvern仪器有限公司;FD-1A-50冷冻干燥机,北京博医康实验仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 总黄酮的提取、纯化和分析

提取:将一定量红豆越橘叶烘干、粉碎,过60目筛,以料液比1:15(g:mL)加入体积分数为60%的乙醇水溶液,室温超声(45W)辅助提取25min,抽滤,残渣重复提取两次,合并滤液后减压旋蒸,除去溶剂,得到粗提液,经-80℃冷冻干燥48h得到棕绿色越橘叶粗提物粉末。

纯化:选用AB-8型大孔树脂纯化越橘叶总黄酮粗提物粉末,上样量为2.0g/L,以体积分数60%乙醇水溶液为洗脱液,4VB洗脱,洗脱流速1.0mL/min,每收集50mL馏分为1份纯化样品,共收集18份纯化后红豆越橘叶黄酮馏分。减压旋蒸,除去溶剂后,再经-80℃冷冻干燥48h得到棕色各馏分纯化物粉末,标记为L1~L18。

分析:采用液相色谱-质谱联用仪分析红豆越橘叶黄酮馏分纯化物粉末。检测条件: 25 °C, Hyperil Gold 色谱柱 (100 mm×2.1 mm×1.9 μm), 正相流动相: A 为体积分数 0.1% 的甲酸水溶液, B 为甲醇; 反相流动相: A 为浓度 5 mmol/L 醋酸铵水溶液 (氨水调节 pH=9), B 为甲醇; 梯度洗脱条件为: 0~9 min, A 与 B 两者体积比 98 : 2; 9~12 min, 两者体积比为 2 : 98; 12~15 min, 两者体积比 98 : 2; 流速为 0.35 mL/min。由 Compound Discoverer 3.2 软件处理结果。

1.2.2 总黄酮含量的测定

参考文献[9]精密称取 10 mg 芦丁于 50 mL 容量瓶中, 加入体积分数为 60% 的乙醇溶解、定容至 50 mL, 制得质量浓度为 0.2 g/L 芦丁标准储备液。准确量取 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL 芦丁标准储备液于 25 mL 容量瓶, 加入体积分数 30% 乙醇 5.0、4.5、4.0、3.5、3.0、2.5 mL。然后加入 0.75 mL 质量分数 5% 亚硝酸钠溶液摇匀, 静置 6 min; 再加入 0.75 mL 质量分数 10% 硝酸铝溶液摇匀, 静置 6 min; 最后加入 10 mL 质量分数 4% 氢氧化钠溶液, 摇匀后用酶标仪测定溶液在 510 nm 处的吸光度, 绘制吸光度 (y) - 芦丁质量浓度 (x) 标准曲线, 经拟合得到标准曲线方程: $y=9.0381x+0.0042$ ($R^2=0.991$)。取适量冻干后的越橘叶粗提物和纯化物, 用无水乙醇溶解后, 测定溶液在 510 nm 处的吸光度, 再根据标准曲线方程得到溶液中总黄酮的质量浓度, 按照公式 (1) 计算得到红豆越橘叶总黄酮含量 (mg/g)。

$$Q = \frac{\rho \times V \times f}{M} \quad (1)$$

式中: Q 为红豆越橘叶中总黄酮含量, mg/g; ρ 为越橘叶总黄酮粗品溶液 (或纯化溶液) 中总黄酮的质量浓度, g/L; V 为越橘叶总黄酮粗品溶液 (或纯化溶液) 的体积, mL; f 为溶液稀释倍数; M 为冻干后越橘叶总黄酮粗提物 (或纯化物) 的质量, g。

1.2.3 纯化黄酮的抗氧化能力测试

通过测定 L1~L18 对 ABTS 自由基、DPPH 自由基的清除能力来评价其抗氧化能力, 得到性能最佳的馏分。

参考文献[10]测试 ABTS 自由基清除能力, 具体步骤为: 称取 0.0384 g 的 ABTS 和 0.0134 g 过硫酸钾, 分别用蒸馏水定容至 10 mL, 将上述两溶液以体积比 1 : 1 混合, 避光冷藏 12 h 后得 ABTS 工作液。使用前, 以浓度为 0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液 (PBS, pH=7.4) 将 ABTS 工作液稀释至在 734 nm 处的吸光度为 0.70 ± 0.02 , 得到 ABTS 测试液。在 96 孔板中加入 50 μL 不同样液 (馏分纯化物用 PBS 溶解), 150 μL 的 ABTS 测试液, 混合避光静置 6 min,

用酶标仪测试不同馏分在 734 nm 处的吸光度, 平行实验 3 次。按公式 (2) 计算样品的 ABTS 自由基清除率。

$$\text{ABTS 自由基清除率} / \% = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0} \right) \times 100 \quad (2)$$

式中: A_1 为 50 μL 样液+150 μL ABTS 测试液的吸光度; A_2 为 50 μL 样液+150 μL 浓度为 0.1 mol/L 的 PBS (pH=7.4) 的吸光度; A_0 为 50 μL 无水乙醇+150 μL ABTS 测试液的吸光度。

参考文献[11]测试 DPPH 自由基清除能力, 具体步骤为: 取适量 DPPH 溶于无水乙醇中配成质量浓度为 100 μg/mL 的储备液, 冷藏避光保存, 使用时用无水乙醇稀释 4 倍得到 DPPH 工作液。在 96 孔板中加入 50 μL 不同馏分, 150 μL 的 DPPH 工作液, 混合避光静置 6 min, 用酶标仪测定不同馏分在 517 nm 处的吸光度, 平行实验 3 次。按公式 (3) 计算样品的 DPPH 自由基清除率。

$$\text{DPPH 自由基清除率} / \% = \left(1 - \frac{A'_1 - A'_2}{A'_0} \right) \times 100 \quad (3)$$

式中: A'_1 为 50 μL 样液+150 μL DPPH 工作液的吸光度; A'_2 为 50 μL 样液+150 μL 无水乙醇的吸光度; A'_0 为 50 μL 无水乙醇+150 μL DPPH 工作液的吸光度。

经测定 L1~L18 中总黄酮含量、ABTS 自由基清除率、DPPH 自由基清除率较高的前 3 份馏分进行后续考察。

1.2.4 抑制 HepG2 细胞增殖能力测试

1.2.4.1 细胞培养

参考文献[12]将 HepG2 细胞培养于含有体积分数 10% 胎牛血清、体积分数 1% 双抗的 DMEM 高糖培养基中, 培养箱条件为 37 °C、体积分数 5% CO₂、1~2 d 更换 1 次培养液, 待细胞处于对数生长周期且汇合度大于 80% 时用胰蛋白酶进行传代。

1.2.4.2 MTT 法检测 HepG2 细胞抑制率

参考文献[12]取对数生长期 HepG2 细胞 (密度为 2×10^4 个/mL), 每个孔 100 μL, 设 3 个复孔接种至 96 孔培养板中, 取适量抗氧化能力好的前 3 个馏分冻干后粉末溶解于培养基 (终体积为 10 μL), 使三者最终质量浓度分别为 5、10、15、20、25、30、35 μg/mL, 培养 24 和 48 h 后, 再向 96 孔培养板中加入 10 μL 的 MTT, 在 37 °C 下培养 4 h, 弃去上层培养液, 向 96 孔培养板中加 100 μL 的 DMSO, 振荡 10 min, 用酶标仪测量溶液在 450 nm 处的吸光度。根据公式 (4) 计算细胞抑制率 (%)。

$$\text{细胞抑制率} / \% = \frac{A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}} \times 100 \quad (4)$$

式中: $A_{\text{空白}}$ 为不含药物、不接种细胞的培养基的吸

光度(用于酶标仪调零); $A_{\text{实验}}$ 为加药培养细胞的吸光度; $A_{\text{对照}}$ 为不加药物正常培养细胞的吸光度。

根据细胞抑制率数据,对抑制HepG2细胞增殖能力最好的馏分(标记为 L_{max}),作为后续实验的馏分。

1.2.5 脂质体的制备与表征

采用乙醇注入法^[13]制备脂质体,经前期响应面法实验优化得到脂质体的最佳制备工艺:按 $m(\text{磷脂}):m(\text{胆固醇})=2.18:1$, $m(\text{磷脂}):m(L_{\text{max}})=10.86:1$ 的比例,将11.7 mg 磷脂、1.1 mg L_{max} 和5.4 mg 胆固醇溶解于2 mL 无水乙醇(磷脂质量浓度为5.85 g/L)中作为油相。另在25 mL 小烧杯中配制浓度为0.1 mol/L的PBS(pH=6.87)作为水相。将注射器中的2 mL 油相快速注入10 mL 水相中于磁力搅拌器上常温搅拌4 h 得到悬浊液。将制备的悬浊液超声(100 W)分散10 min 后过0.22 μm 滤膜,得到新鲜脂质体溶液($L_{\text{max}}\text{-Lips}$)。

通过滴注法^[14]制备羧甲基壳聚糖修饰的 $L_{\text{max}}\text{-Lips}$ (CMCS- $L_{\text{max}}\text{-Lips}$)。首先将一定量CMCS溶解于蒸馏水中配成质量分数分别为0.2%、0.4%、0.6%、0.8%和1.0%的CMCS溶液,然后在室温搅拌下,将CMCS溶液滴加到含有等体积的新鲜脂质体溶液中搅拌30 min,即得CMCS- $L_{\text{max}}\text{-Lips}$ 。

脂质体包封率测定:采用离心法^[15]测定脂质体包封率。取1 mL 脂质体溶液($L_{\text{max}}\text{-Lips}$)于离心管中8000 r/min 离心15 min 后取上清液,加入适量无水乙醇破乳,再用无水乙醇定容至5 mL,用紫外-可见分光光度计测定溶液在510 nm 处的吸光度($A_{\text{游}}$)。另取1 mL 脂质体溶液直接用无水乙醇定容至5 mL,用酶标仪测其在510 nm 处的吸光度($A_{\text{总}}$)。根据公式(5)计算包封率(%)。

$$\text{包封率}/\% = \frac{A_{\text{总}} - A_{\text{游}}}{A_{\text{总}}} \times 100 \quad (5)$$

脂质体粒径分布、Zeta 电位测定:采用激光粒度分析仪在25 $^{\circ}\text{C}$ 下量化平均粒径、多分散性指数(PDI)和Zeta 电位。为了减少各种散射效应,将样品在PBS中稀释10倍。

1.2.6 FTIR 测试

将冻干后的 $L_{\text{max}}\text{-Lips}$ 、CMCS- $L_{\text{max}}\text{-Lips}$ 粉末用玛瑙研钵充分研磨,过200目筛后,与溴化钾在压片机模型中,设置压力2 t 制成直径7 mm 透光薄片。对CMCS、 $L_{\text{max}}\text{-Lips}$ 和CMCS- $L_{\text{max}}\text{-Lips}$ 进行FTIR测试,波数范围在4000~400 cm^{-1} 。

1.2.7 体外释放能力测试

参考文献[16]测定样品的体外释放能力,具体步骤为:移取2 mL 的 $L_{\text{max}}\text{-Lips}$ 和CMCS- $L_{\text{max}}\text{-Lips}$ 于煮沸的透析袋(截留相对分子质量为8000~

14000 kDa)中,分别放于pH为4.0、6.5和7.4的释放介质中,然后用锡纸密封烧杯,并置于恒温摇床中,在温度37 $^{\circ}\text{C}$,转速60 r/min。每隔一段时间,从烧杯中取出1 mL 的PBS透析液,并加入1 mL 新鲜的PBS。按1.2.2节中方法测定透析液中总黄酮含量,按公式(6)计算黄酮累积释放率($Q_{\text{释}}$,%)。

$$\text{累积释放率}/\% = \frac{(\rho_1 + \rho_2 + \dots + \rho_{n-1}) \times V_1 + \rho_n \times V_2}{M} \times 100 \quad (6)$$

式中: ρ_n 为各时间点取样后的样品质量浓度,g/L; M 为黄酮投料量,mg; V_1 为各时间点固定取样体积,mL; V_2 为溶出介质体积,mL。

Origin2022 软件可进行药物释放率曲线拟合。为考察脂质体的释放模型,将累积渗透率分别进行零级释放动力学、一级释放动力学、Higuchi 释放模型、Peppas 释放模型和Weibull 释放模型的拟合。比较 R^2 大小,最接近1的为最适模型。

1.2.8 脂质体对HepG2细胞增殖、迁移和细胞周期的影响实验

细胞增殖:采用1.2.4.2节方法测试 $L_{\text{max}}\text{-Lips}$ 和CMCS- $L_{\text{max}}\text{-Lips}$ 对HepG2细胞增殖的影响。

迁移能力:将HepG2细胞接种于6孔板,待细胞密度长至80%,用移液器吸头将细胞垂直划伤,用PBS(0.01 mol/L, pH=7.3~7.5,下同)轻轻冲洗表面,分别加入 L_{max} 和CMCS- $L_{\text{max}}\text{-Lips}$,培养48 h 后拍照记录,利用ImageJ软件计算各部分面积得到迁移率。

为了研究经CMCS 包衣的脂质体是否能诱导HepG2细胞的周期紊乱,取一定量 L_{max} 和CMCS- $L_{\text{max}}\text{-Lips}$ 溶于培养基使溶液最终质量浓度为18 $\mu\text{g}/\text{mL}$,对碘化丙啶染色的细胞核进行流式细胞术分析:将HepG2细胞接种在6孔板中,控制每孔密度为 1×10^6 个/mL,用 L_{max} 和CMCS- $L_{\text{max}}\text{-Lips}$ 处理24 h。然后消化收集细胞,用预冷PBS洗涤并离心(1000 r/min, 5 min)。在清洗后的细胞中加入1 mL 冰浴预冷体积分数70%的乙醇溶液(用PBS配制)固定24 h,再次离心洗涤。然后弃去上清液,加入适量现配的染液(按细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒说明现配现用)重悬混匀,转入流式管中室温下避光孵育30 min,立即使用流式细胞仪检测G1期(间期)、S期(合成)和G2期(间期)细胞数目占细胞总数的百分比。

1.3 数据处理

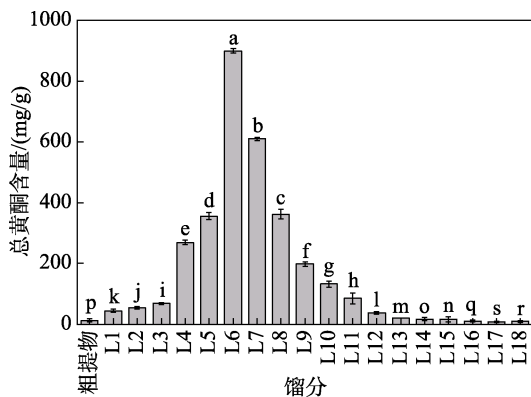
所有数据均为3次平行实验的算数平均值 \pm 标准偏差,所得实验数据运用SPSS22、Origin2022、Compound Discoverer 3.2等软件分析,讨论时均使用平均值。

2 结果与讨论

2.1 红豆越橘叶总黄酮含量和抗氧化能力分析

图 1 为 AB-8 型大孔树脂纯化越橘叶总黄酮粗品得到的 18 份馏分中越橘叶总黄酮含量。

从图 1 可以看出, 18 份馏分 (L1~L18) 中, L6 总黄酮含量最高 (899.44 mg/g), 其次是 L7 (610.37 mg/g) 和 L5 (356.15 mg/g)。经公式 (1) 计算, 红豆越橘叶粗品中总黄酮含量为 13.73 mg/g, L6 的总黄酮含量为粗品的 65.5 倍。AB-8 型大孔树脂纯化工艺有效提高了红豆越橘叶总黄酮的含量。



不同字母表示组间差异性显著 ($P < 0.05$), 下同

图 1 纯化后不同馏分中越橘叶总黄酮含量

Fig. 1 Contents of total flavonoid in different fractions of lingonberry leaves after purification

用 HPLC-MS 分析越橘叶总黄酮提取物 L6, 其总离子流色谱图见图 2。所得结果用 Compound Discoverer 3.2 软件分析, 经比对鉴别出的化合物成分如表 1 所示。

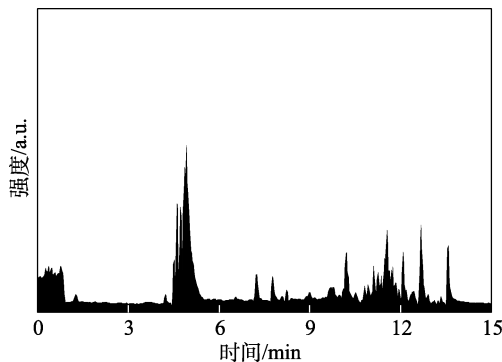


图 2 纯化 L6 组分黄酮总离子流图

Fig. 2 Total ion flow diagram of purified L6 component flavonoid

综上, 纯化后越橘叶黄酮 L6 组分主要鉴定出 7 种成分, 分别为芦丁、槲皮素、槲皮素-3-O-葡萄糖醛酸苷、槲皮素 3-O-鼠李糖苷-7-O-葡萄糖苷、圣草酚-7-O-葡萄糖苷、儿茶素和绿原酸。其中, 芦丁、

槲皮素、槲皮素-3-O-葡萄糖醛酸苷、槲皮素 3-O-鼠李糖苷-7-O-葡萄糖苷、圣草酚-7-O-葡萄糖苷和儿茶素为黄酮类化合物, 绿原酸为多酚类化合物, 都具有抗氧化和抑制癌细胞增殖的能力。为验证纯化后越橘叶黄酮功能活性, 进行了后续抗氧化能力分析和对 HepG2 细胞增殖影响分析实验。

表 1 HPLC-MS 检测纯化后 L6 组分化合物鉴定
Table 1 Identification of L6 compounds after purification by HPLC-MS

序号	化合物	保留时间/min	相对分子质量	分子式	参考文献
1	芦丁	10.760	610.16098	$C_{27}H_{30}O_{16}$	[17]
2	槲皮素	8.157	303.29283	$C_{15}H_{10}O_7$	[18]
3	槲皮素-3-O-葡萄糖醛酸苷	5.930	478.07478	$C_{21}H_{18}O_{13}$	[19]
4	槲皮素 3-O-鼠李糖苷-7-O-葡萄糖苷	10.850	610.16098	$C_{27}H_{30}O_{16}$	[19]
5	圣草酚-7-O-葡萄糖苷	9.730	462.12333	$C_{22}H_{22}O_{11}$	[20]
6	儿茶素	4.920	290.07918	$C_{15}H_{14}O_6$	[21]
7	绿原酸	4.790	354.09526	$C_{16}H_{18}O_9$	[22]

图 3 为 L1~L18 对 ABTS 和 DPPH 自由基清除率测试结果。

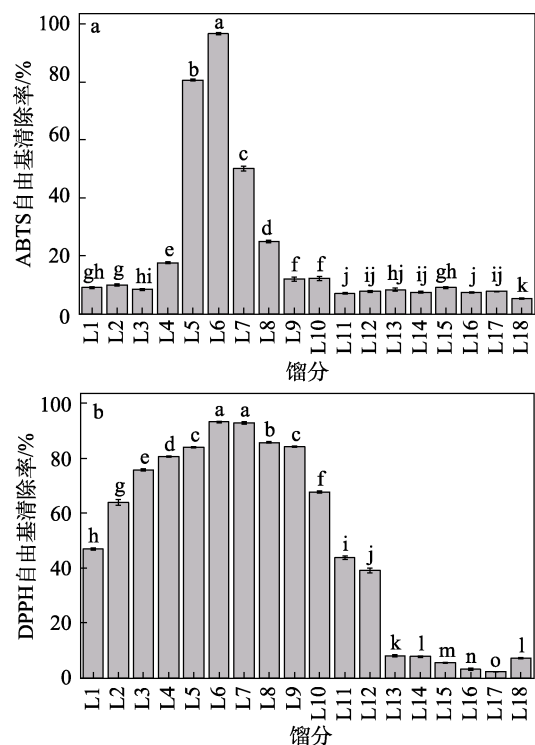


图 3 纯化后越橘叶黄酮各组分的 ABTS 自由基清除率 (a)、DPPH 自由基清除率 (b)

Fig. 3 ABTS free radical scavenging rate (a) and DPPH free radical scavenging rate (b) of flavonoid components in lingonberry leaves after purification

从图 3 可以看出, 总黄酮含量较高前 3 个馏分为 L5、L6 和 L7 也具有较强的 ABTS 和 DPPH 自由基清除能力, 说明馏分中, ABTS 和 DPPH 自由基清除率和总黄酮含量呈正相关。因此, 后续实验选择 L5、L6 和 L7。

2.2 纯化后越橘叶黄酮组分对 HepG2 细胞增殖的影响

肝脏是类黄酮代谢的主要器官之一, 天然植物中的酚酸和黄酮类成分可穿透癌细胞的细胞膜, 产生很强的抗增殖作用, 黄酮类化合物的抗癌作用机制涉及多种细胞过程, 包括 DNA 损伤、细胞程序性死亡、炎症性肿瘤微环境和肿瘤血管生成, 但哪些特定成分抑制了 HepG2 的生长仍有待验证^[23-24]。图 4 为 L5、L6 和 L7 对 HepG2 细胞增殖的影响结果。

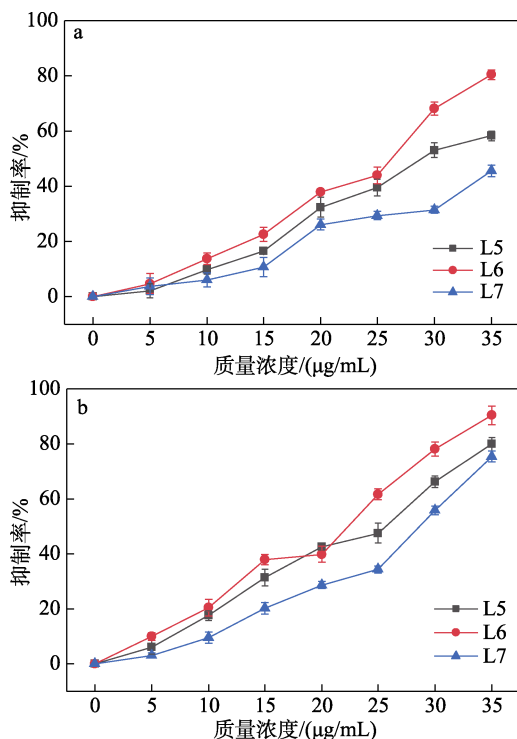


图 4 不同质量浓度 L5、L6 和 L7 的 24 h (a)、48 h (b) 的 HepG2 细胞抑制率

Fig. 4 Proliferation rates of HepG2 cells at 24 h (a) and 48 h (b) at different mass concentrations of L5, L6 and L7

从图 4 可以看出, L5、L6 和 L7 可降低 HepG2 细胞活力, 且具有剂量依赖性和时间依赖性。其中, L6 抑制 HepG2 细胞增殖的能力最好, L6 培养 HepG2 细胞 24 和 48 h 后, 其半数抑制浓度 (IC₅₀) 分别为 24.96 和 18.37 µg/mL。L6 组分抑制 HepG2 细胞增殖的效果优于其他组分的原因可能是其总黄酮含量最高 (899.44 mg/g), 所以抗氧化能力最强。综上, 选择 L6 作为芯材用于质脂体的制备。

2.3 脂质体的粒径与电位分析

图 5 为不同质量分数的 CMCS 对脂质体的粒径、PDI、Zeta 电位和包封率的影响。

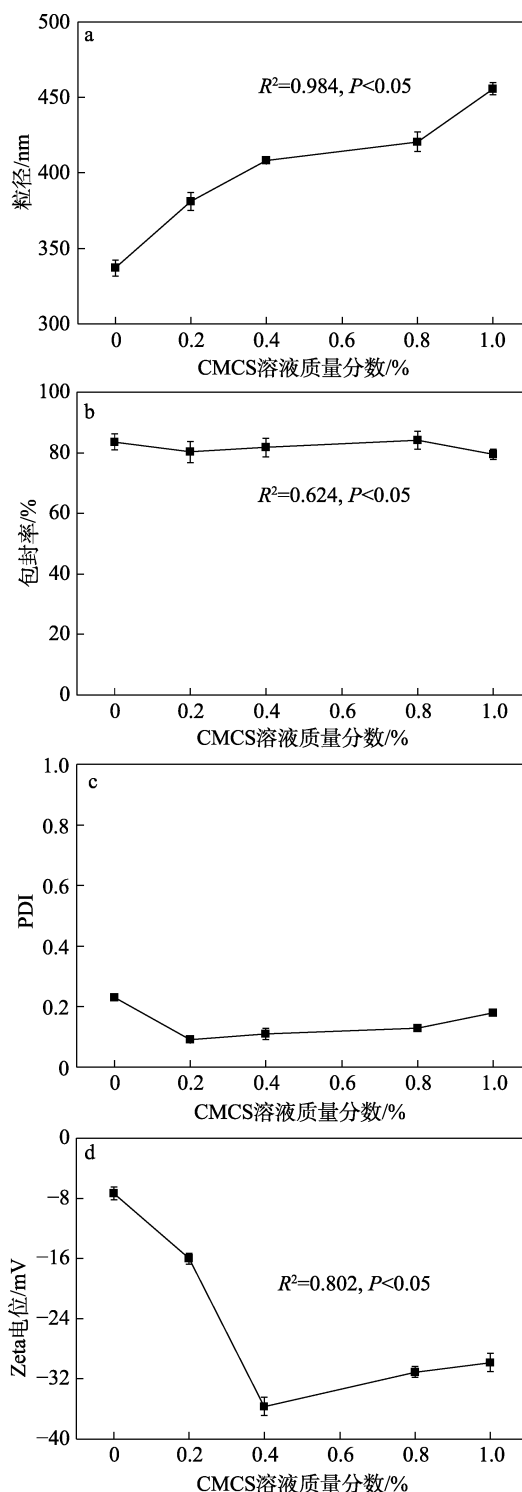


图 5 CMCS 质量分数对脂质体粒径 (a)、包封率 (b)、PDI (c) 和 Zeta 电位 (d) 的影响

Fig. 5 Effects of CMCS mass fraction on particle size (a), encapsulation rate (b), PDI (c), and Zeta potential (d) of liposomes

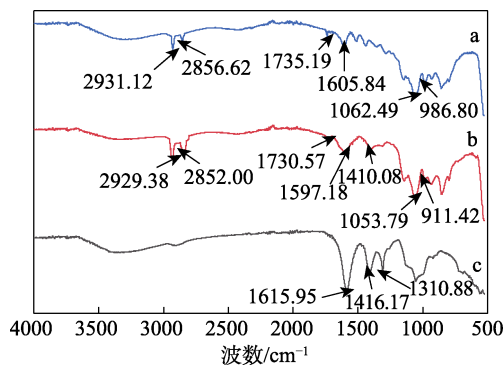
由图 5 可见, CMCS 质量分数与脂质体粒径间相关系数最高 (R²=0.984, P<0.05), 与包封率间的

相关系数最低 ($R^2=0.624, P<0.05$), 与 Zeta 电位的相关性 ($R^2=0.802, P<0.05$) 略低于粒径, 与 PDI 间不具有相关性。L6-Lips 的平均粒径为 337.09 nm, 随着 CMCS 质量分数的增加, 脂质体平均粒径逐渐增大, CMCS-L6-Lips 的粒径与 CMCS 质量分数呈正相关。原因可能是, 较高质量分数的 CMCS 溶液增大了脂质体的外层厚度。CMCS 溶液的质量分数对脂质体的包封率影响较小, 这一发现与其他研究一致^[13,25]。PDI 通常用作量化胶体系统中颗粒直径分布的度量。PDI 越低表明颗粒直径分布越窄, 颗粒尺寸的均匀性越高^[26]。不同质量分数的 CMCS 溶液的脂质体 PDI 为 0.09~0.23, 这证明脂质体尺寸分布良好。这可能是因为, CMCS 涂层提供了一个带电的表面, 静电斥力可以防止颗粒聚集。

随着 CMCS 溶液质量分数的增加, 脂质体的 Zeta 电位的绝对值先增加后降低, 最终 Zeta 电位达到相对稳定的值。当 CMCS 溶液质量分数为 0.4% 时, Zeta 电位为 -35.65 mV, 绝对值最大, 此时为 CMCS 溶液质量分数最佳, 表明 CMCS 成功附着在脂质体表面且脂质体颗粒之间的排斥力明显更强, 稳定性更大。

2.4 FTIR 分析

图 6 为 L6-Lips、CMCS 和 CMCS-L6-Lips 的 FTIR 谱图。



a—L6-Lips; b—CMCS-L6-Lips; c—CMCS

图 6 脂质体的 FTIR 谱图

Fig. 6 FTIR spectra of liposomes

从图 6 可以看出, L6-Lips 和 CMCS-L6-Lips 的谱图中均出现磷脂双分子层的界面极性特征基团 (C=O 和 P=O), 以及双分子层内部非极性特征基团 (-CH₂)。1735.19 cm⁻¹ 处对应于 C=O 键的对称伸缩振动吸收峰移动到 1730.57 cm⁻¹ 处, 且峰强度降低, 表明双层膜的 C=O 区域与 CMCS 之间形成了氢键。此外, 986.80 cm⁻¹ 处对应于 N⁺(CH₃)₃ 的反伸缩振动峰移动到 911.42 cm⁻¹ 处, 证明 CMCS 对 L6-Lips 磷脂双分子层界面有氢键作用。相比之下, 2856.62 cm⁻¹ 处对应于 -CH₂ 的拉伸振动吸收峰

在涂覆 CMCS 后仅发生细微变化, 表明 CMCS 对双层的内部没有影响^[25]。

2.5 体外释放能力分析

图 7 为在 pH=4.0、6.5 和 7.4 时, L6 从脂质体中的释放情况。

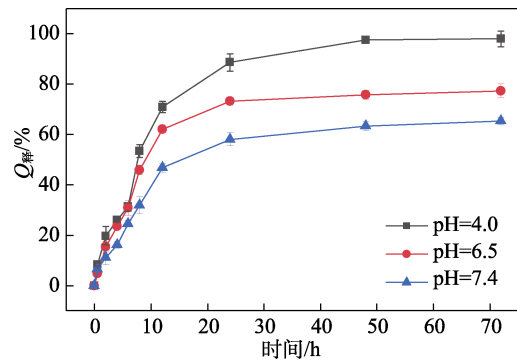


图 7 不同 pH 释放介质中 CMCS-L6-Lips 累积释放率
Fig. 7 Cumulative release of CMCS-L6-Lips in different pH release media

从图 7 可以看出, 在透析的前 12 h, CMCS-L6-Lips 在 pH 6.5 和 7.4 的释放介质中迅速释放, 释放率约为 62% 和 47%, 24 h 后释放情况趋于稳定, 释放率约为 73% 和 58%。相比之下, pH 4.0 的释放速率明显更快, 在透析 24 h 时累积释放率可达 88.6%, 48 h 后释放速率逐渐稳定, 其累积释放率为 98.03%。综上, 随着 PBS 缓冲液 pH 的降低, CMCS-L6-Lips 的药物释放速率呈现上升趋势, 因此, CMCS-L6-Lips 的药物释放行为明显表现出 pH 敏感特性。

研究认为, 与周围组织和血液的 pH (7.4) 相比, 肿瘤细胞具有较低的细胞外 pH (6.3~6.8)^[27-28], 如果脂质体对该范围内的 pH 有响应, 即可将药物直接释放到肿瘤细胞附近达到预期的治疗效果。

本文实验结果与 WANG 等^[29]设计制备羧甲基壳聚糖和十八胺包被的 Wacao 五环三萜皂苷脂质体, ZHU 等^[30]利用 N,N'-双(丙烯酰)半胺 (BAC) 和交联 CMCS 负载阿霉素制备的纳米颗粒可诱导氧化还原和具有 pH 敏感活性的实验结果一致。

为了更深入地了解 CMCS-L6-Lips 的释放模型和机理, 采用零级动力学、一级动力学、Peppas、Higuchi 和 Weibull 5 种数学模型对 CMCS-L6-Lips 的释放数据进行了拟合分析, 相关系数 (R^2) 见表 2。

从表 2 可以看出, Weibull 模型 R^2 最高, 为 0.98890, 表明它是描述 CMCS-L6-Lips 释放动力学的最适模型。Weibull 模型是药物释放领域中广泛使用的经验模型, 特别是对于快速和持续释放曲线^[31]。此模型中当 $\beta \leq 0.75$ 时, 表明药物释放机制为 Ficks 扩散; 当 $0.75 < \beta < 1$ 之间时, 其药物释放机制涉及 Ficks 扩散和骨架溶蚀; 当 $\beta > 1$ 时, 为骨架溶蚀机

制^[32-33]。根据表 2 提供的信息, $\beta > 1$ 可以将其释放机制归类为骨架溶蚀。因此, 这是一个复杂的释放过程, 即释放速率呈非线性增加, 直到达到拐点, 然后以渐近方式逐渐降低^[34-35]。

表 2 CMCS-L6-Lips 与不同数学模型的拟合结果

Table 2 Fitting results of CMCS-L6-Lips with different mathematical models

模型	方程	R ²
Peppas	$Q=21.05653t^{0.38856}$	0.90489
Higuchi	$Q=12.98164t^{0.5}+6.33137$	0.87595
零级动力学方程	$Q=1.29748t+26.49863$	0.65957
一级动力学方程	$Q=100(1-e^{-0.08796t})$	0.98637
Weibull	$Q=1-e^{-(t-1.08973) \times 1.36931/28.419863}$	0.98890

注: Q 为累积释放率, %; t 为时间, h。

2.6 脂质体对 HepG2 细胞增殖的影响分析

图 8 为 CMCS-L6-Lips、L6-Lips、L6 对 HepG2 细胞增殖的影响。

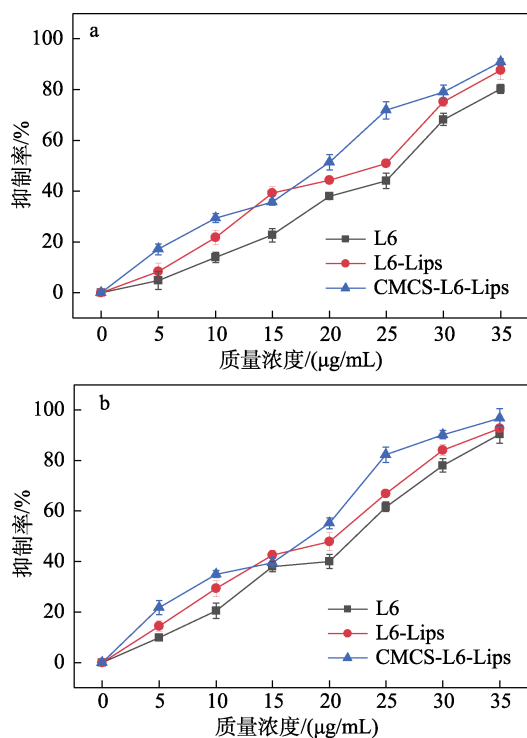


图 8 不同质量浓度 L6、L6-Lips 和 CMCS-L6-Lips 的 24 h (a)、48 h (b) 的 HepG2 细胞抑制率

Fig. 8 24 h (a) and 48 h (b) proliferation rates of HepG2 cells at different mass concentrations of L6, L6-lips and CMCS-L6-Lips

从图 8 可以看出, 在质量浓度为 0~35 µg/mL 的剂量范围内, 经 24 和 48 h 加药培养后对细胞毒性的最终强弱分别为: CMCS-L6-Lips>L6-Lips>L6。培养 48 h 后, CMCS-L6-Lips 的 IC₅₀ 为 13.75 µg/mL, 对 HepG2 细胞的抑制能力最强。这可能是由于肿瘤细胞周围 pH 较低, CMCS 是一种两性多糖, 带有胺基和羧基, 因此, pH 对其电荷有显著影响。当

pH<6.5 时, CMCS 中的 -NH₂ 质子化为 -NH₃⁺, 分子间作用力改变, 实现了药物的缓控释放^[36]。与 L6 相比, L6-Lips 对 HepG2 细胞的增殖抑制效果更明显。原因可能是 L6 主要成分为黄酮难溶于水, 在细胞培养基中析出, 难以被细胞内化而发挥抗肿瘤作用, 但脂质体的类生物膜结构增加了细胞对药物的摄取, 所以在药物培养剂量相同的条件下, L6-Lips 比 L6 抑制肿瘤细胞增殖能力更强^[37]。

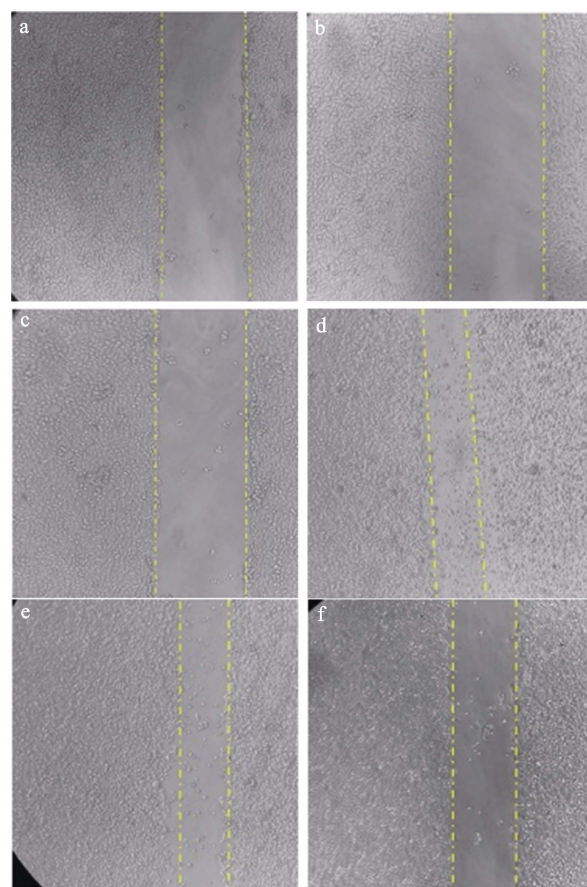
表 3 L6、L6-Lips 和 CMCS-L6-Lips 培养 HepG2 细胞 24、48 h 的半数抑制浓度 (IC₅₀)

Table 3 Half inhibitory concentration (IC₅₀) of L6, L6-Lips and CMCS-L6-Lips cultured HepG2 cells for 24 and 48 h

组别	IC ₅₀ /(µg/mL)	
	24 h	48 h
L6	24.96±1.43 ^b	18.37±1.85 ^c
L6-Lips	18.60±0.67 ^c	17.40±2.14 ^{cd}
CMCS-L6-Lips	16.12±0.32 ^c	13.75±2.59 ^d

2.7 脂质体对 HepG2 细胞迁移能力的影响分析

图 9 和图 10 分别为 L6 和 CMCS-L6-Lips 对 HepG2 细胞迁移率实物图和统计结果。



空白组: a—0 h, d—48 h; L6: b—0 h, e—48 h; CMCS-L6-Lips: c—0 h, f—48 h

图 9 L6 和 CMCS-L6-Lips 对 HepG2 细胞迁移的实物图
Fig. 9 Photos of L6 and CMCS-L6-Lips on HepG2 cell migration

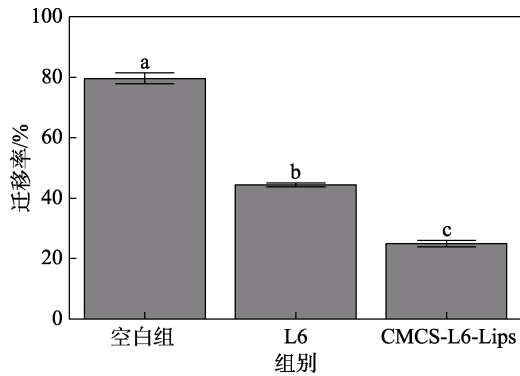


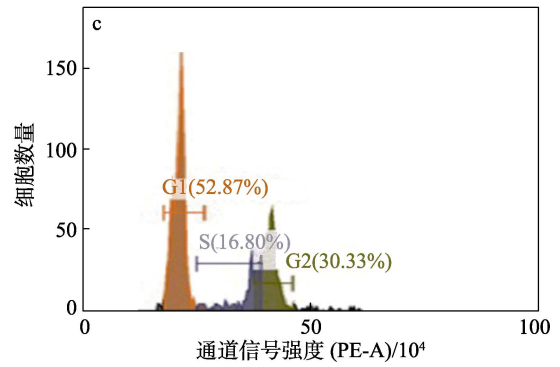
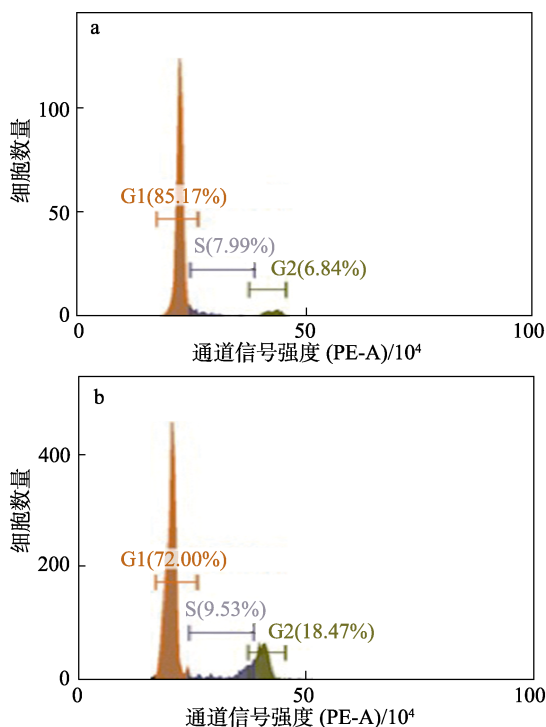
图 10 L6 和 CMCS-L6-Lips 对 HepG2 细胞迁移率的影响
Fig. 10 Effects of L6, CMCS-L6-Lips on migration rate of HepG2 cells

从图 9 可以看出,与空白组相比,CMCS-L6-Lips 组划痕宽度最大,L6 组划痕宽度略小于 CMCS-L6-Lips 组。L6 组和 CMCS-L6-Lips 组都可降低 HepG2 细胞伤口愈合能力,且 CMCS-L6-Lips 组抑制能力最强。

从图 10 可以看出,L6 组和 CMCS-L6-Lips 组在药物质量浓度 18 μg/mL,处理 48 h 后都抑制了 HepG2 细胞迁移能力,空白组、L6 和 CMCS-L6-Lips 迁移率分别为 79.93%、44.61%和 25.22%,CMCS-L6-Lips 抑制能力明显强于 L6。

2.8 脂质体对 HepG2 细胞周期的影响分析

图 11 和图 12 分别为 L6 和 CMCS-L6-Lips 对 HepG2 细胞周期影响的流式细胞术分布图和统计结果。



a—空白组; b—L6; c—CMCS-L6-Lips; PE-A 为荧光强度 A 信号曲线下积分面积

图 11 流式细胞术检测 HepG2 细胞周期分布

Fig. 11 Cell cycle distribution of HepG2 detected by flow cytometry

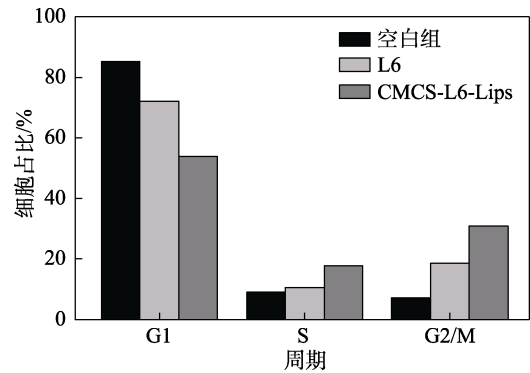


图 12 L6 和 CMCS-L6-Lips 对 HepG2 细胞周期的影响
Fig. 12 Effects of L6, CMCS-L6-Lips on HepG2 cell cycle

从图 11 和图 12 可以看出,与空白组相比,加入 L6 和 CMCS-L6-Lips 的两组 G1 期细胞数量减少,较空白组分别减少 13.17%和 32.30%,而 S 期细胞数量分别增加 1.54%和 8.81%,同时 G2 期细胞数量分别增加 11.63%和 23.49%,说明分离纯化后的 L6 组分可阻滞 HepG2 细胞停留在 S 期和 G2 期,使 G1 期细胞数量明显减少。且经包封后的 CMCS-L6-Lips 的阻滞效果明显优于未包封组。

3 结论

采用活性跟踪的方式对越橘叶黄酮进行提取,并使用 AB-8 型大孔树脂进行纯化,得到总黄酮含量 (899.44 mg/g) 最高馏分 L6。以 L6 为芯材,采用乙醇注入法制备了脂质体 L6-Lips,经羧甲基壳聚糖修饰制备了 CMCS-L6-Lips。

(1) L6 主要成分包括芦丁、槲皮素、槲皮素-3-O-葡萄糖醛酸苷、槲皮素 3-O-鼠李糖苷-7-O-葡萄糖苷、圣草酚-7-O-葡萄糖苷、儿茶素和绿原酸 7 种成分。L6 具有较强的 ABTS 和 DPPH 自由基清除能力;对 HepG2 细胞 24 和 48 h 的 IC₅₀ 分别为 24.96 和 18.37 μg/mL。

(2) CMCS 质量分数与 CMCS-L6-Lips 粒径、包封率间、Zeta 电位具有相关性, 与 PDI 不具有相关性。CMCS 溶液最佳质量分数为 0.4%, 此时, Zeta 电位为 -35.65 mV, 表明 CMCS 成功附着在 L6-Lips 表面, 且 CMCS-L6-Lips 颗粒之间的排斥力明显更强, 稳定性更高。

(3) CMCS-L6-Lips 具有 pH 敏感性, 在 pH=4.0 时体外释放能力最高, 动力学方程符合 Weibull 模型, 为骨架溶蚀释放。CMCS-L6-Lips 可有效抑制 HepG2 细胞增殖, 减缓细胞迁移能力并阻滞细胞停留在 S 期和 G2 期, 且效果优于 L6-Lips。

(4) 脂质体包裹有效提高了越橘叶黄酮的溶解性, 使细胞对药物摄取的能力提升, CMCS 的修饰增加了脂质体的靶向能力, 有利于肿瘤治疗。

羧甲基壳聚糖包裹的脂质体可作为一种有前途的递送系统用于疾病治疗。

参考文献:

- ZENG X T, LIU H P, HUANG Z P, *et al.* Anticancer effect of arbutin on diethylnitrosamine-induced liver carcinoma in rats *via* the GRP and GADD pathway[J]. *Journal of Environmental Pathology Toxicology and Oncology*, 2022, 41(1): 15-26.
- LU M L, HUANG L H, ZHAN S W, *et al.* pH-sensitive nanoparticles for high loading and efficient delivery of doxorubicin[J]. *Journal of Wuhan University of Technology-Materials Science Edition*, 2023, 38(4): 929-937.
- LIU J, HEFNI M E, WITTHOFT C M. Characterization of flavonoid compounds in common swedish berry species[J]. *Foods*, 2020, 9(3): 358.
- SZAKIEL A, PACZKOWSKI C, KOIVUNIEMI H, *et al.* Comparison of the triterpenoid content of berries and leaves of lingonberry *Vaccinium vitis-idaea* from finland and poland[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60(19): 4994-5002.
- VYAS P, KALIDINDI S, CHIBRIKOVA L, *et al.* Chemical analysis and effect of blueberry and lingonberry fruits and leaves against glutamate-mediated excitotoxicity[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61(32): 7769-7776.
- LANDI-LIBRANDI A P, CALEIRO SEIXAS AZZOLINI A E, DE OLIVEIRA C A, *et al.* Inhibitory activity of liposomal flavonoids during oxidative metabolism of human neutrophils upon stimulation with immune complexes and phorbol ester[J]. *Drug Delivery*, 2012, 19(4): 177-187.
- LIU G Y, HOU S L, TONG P H, *et al.* Liposomes: Preparation, characteristics, and application strategies in analytical chemistry[J]. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 2022, 52(2): 392-412.
- ASHRAFIZADEH M, DELFI M, ZARRABI A, *et al.* Stimuli-responsive liposomal nanoformulations in cancer therapy: Pre-clinical & clinical approaches[J]. *Journal of Controlled Release*, 2022, 351: 50-80.
- STEFANESCU B E, CALINOIU L F, RANGA F, *et al.* Chemical composition and biological activities of the nord-west romanian wild bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) and lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) leaves [J]. *Antioxidants*, 2020, 9(6): 495.
- FAN Z L, LI L, BAI X L, *et al.* Extraction optimization, antioxidant activity, and tyrosinase inhibitory capacity of polyphenols from *Lonicera japonica*[J]. *Food Science & Nutrition*, 2019, 7(5): 1786-1794.
- YI Y T (羿月同), LI S S (李莎莎), FAN Z L (樊梓莺), *et al.* Synergism antioxidation of *Lingonberry anthocyanin* and *Lonicera japonica* polyphenols[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2021, 38(5): 967-972, 1029.
- GAO X, JIA Y, SANTHANAM R K, *et al.* Garlic flavonoids alleviate induced oxidative damage in L02 cells and induced apoptosis in HepG2 cells by Bcl-2/Caspase pathway[J]. *Journal of Food Science*, 2021, 86(2): 366-375.
- YANG C, GONG L, LI X, *et al.* Carboxymethyl chitosan coated alpha-linolenic acid nanoliposomes: Preparation, stability and release *in vitro* and *in vivo*[J]. *Food Chemistry*, 2023, 404: 134526.
- SONG F F, TIAN S J, CHEN F S, *et al.* Carboxymethyl chitosan-decorated proliposomes as carriers for improved stability and sustained release of flaxseed oil[J]. *Journal of Food Science*, 2020, 85(10): 3237-3243.
- PENG S F, ZOU L Q, LIU W L, *et al.* Hybrid liposomes composed of amphiphilic chitosan and phospholipid: Preparation, stability and bioavailability as a carrier for curcumin[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2017, 156: 322-332.
- LI Y Y, SUN K Y, CHEN S N, *et al.* Nano-resveratrol liposome: Physicochemical stability, *in vitro* release, and cytotoxicity[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2023, 195(10): 5950-5965.
- DONG Q, HU N, YUE H L, *et al.* Rapid screening of α -glucosidase inhibitors in *Hypericum perforatum* L. using bio-affinity chromatography coupled with UPLC/MS[J]. *Biomedical Chromatography*, 2023, 37(2): e5536.
- XING Y Z (熊蕊姿), ZHAO Z (赵振), CHENG J (成婧), *et al.* Analysis and identification of main chemical components in ethanol extract of ramie seeds based on UPLC-Orbitrap-HRMS technology[J]. *Modern Food Science and Technology (现代食品科技)*, 2022, 38(2): 245-255.
- WANG L (王陆). Qualitative analysis and *in vivo* metabolic profile study of *Lagotis brachystachys* Maxim based on UPLC-Q-TOF-MS technology[D]. Nanchang: Jiangxi University of Chinese Medicine (江西中医药大学), 2021.
- ZOU J (邹瑾), ZHOU J C (周金彩), LONG H P (龙红萍), *et al.* Chemical constituents of *Selaginella* Yanzhou were analyzed by UPLC-ESI-Q-TOF-MS method[J]. *Chinese Traditional Patent Medicine (中成药)*, 2018, 40(10): 2334-2337.
- KANG Y (康莹), MAO Y N (毛怡宁), WANG F F (王方方), *et al.* Analysis of chemical components in leaves of *Hippophae rhamnoides* by UPLC-LTQ Orbitrap MS[J]. *Modern Chinese Medicine (中国现代中药)*, 2018, 20(11): 1340-1346, 1366.
- ZHANG J C (张佳婵), WANG C T (王昌涛), ZHAO D (赵丹), *et al.* Qualitative and quantitative analysis of sea buckthorn seed extract and its antioxidant effect in liver of aging mice[J]. *Food Science (食品科学)*, 2019, 40(2): 229-238.
- RUPASINGHE V, NEIR S V, PARMAR I. Polyphenol characterization, anti-oxidant, anti-proliferation and anti-tyrosinase activity of *Cranberry pomace*[J]. *Functional Foods in Health and Disease*, 2016, 6: 754-768.
- LI M, QIAN M Q, JIANG Q, *et al.* Evidence of flavonoids on disease prevention[J]. *Antioxidants*, 2023, 12(2): 527.
- WANG Q, LV S, LU J F, *et al.* Characterization, stability, and *in vitro* release evaluation of carboxymethyl chitosan coated liposomes containing fish oil[J]. *Journal of Food Science*, 2015, 80(7): C1460-C1467.
- RUOZI B, TOSI G, FORNI F, *et al.* Atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy: Two techniques for rapid characterization of liposomes[J]. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2005, 25(1): 81-89.
- YU Z J, MA L, YE S J, *et al.* Construction of an environmentally friendly octenylsuccinic anhydride modified pH-sensitive chitosan nanoparticle drug delivery system to alleviate inflammation and oxidative stress[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2020, 236: 115972.