

乙醇注入法制备肉桂醛脂质体的工艺优化

Preparation and response surface optimization of cinnamaldehyde liposome by ethanol injection

常大伟¹ 闫瑾¹ 雷琦¹ 王虎玄¹ 王欢²

CHANG Da-wei¹ YAN Jin¹ LEI Qi¹ WANG Hu-xuan¹ WANG Huan²

(1. 陕西科技大学食品与生物工程学院, 陕西 西安 710021; 2. 杨凌质量技术监督检测检验所, 陕西 杨凌 712100)

(1. School of Food and Biological Engineering, Shaanxi University of Science & Technology, Xi'an, Shaanxi 710021, China; 2. Yangling Quality Technology Inspection Institute, Yangling, Shaanxi 712100, China)

摘要:目的: 确定肉桂醛脂质体的最佳制备工艺条件, 得到具有较高包封率和稳定性的肉桂醛脂质体。方法: 采用乙醇注入法制备肉桂醛脂质体, 考察蛋黄卵磷脂质量浓度、蛋黄卵磷脂与胆固醇质量比、蛋黄卵磷脂与肉桂醛质量比及注射速度对肉桂醛脂质体包封率、粒径、多分散指数的影响, 并利用响应面法进行工艺优化。结果: 肉桂醛脂质体制备的最佳工艺为蛋黄卵磷脂质量浓度 2.69 mg/mL, $m_{\text{蛋黄卵磷脂}} : m_{\text{肉桂醛}}$ 为 6.73 : 1.00, $m_{\text{蛋黄卵磷脂}} : m_{\text{胆固醇}}$ 为 5.79 : 1.00, 在此条件下, 肉桂醛脂质体包封率为 82.37%, 粒径为 113.89 nm, zeta 电位为 -29.07 mV。在 4 °C 下贮藏 4 周后, 仍有较高的包封率, 稳定性良好。结论: 使用乙醇注入法可以制备粒径小、包封率高、性质稳定的肉桂醛脂质体。

关键词: 肉桂醛; 脂质体; 包封率; 乙醇注入法

Abstract: Objective: Cinnamaldehyde was encapsulated in the liposome. **Methods:** Cinnamaldehyde was selected as the research object and the cinnamaldehyde liposomes were prepared by ethanol injection method. The effects of phospholipid concentration, ratio of phospholipid to cholesterol, ratio of phospholipid to cinnamaldehyde and injection velocity on the encapsulation efficiency, particle size and polydispersity index (PDI) of cinnamaldehyde liposomes were investigated, and the process was optimized by response surface method with the encapsulation efficiency as the index. **Results:** The optimum preparation conditions of cinnamaldehyde liposomes were as follows: the phospholipid concentration was 2.69 mg/mL, the ratio of phospholipid to cinnamaldehyde was 6.73, and the ratio of phospholipid to cholesterol was 5.79. Under the control of these conditions, the encapsulation efficiency of cinnamaldehyde liposome was 82.37%, and the particle size and zeta potential were 113.89 nm, and -29.07 mV, respectively. After 4 weeks of storage at 4 °C, it still has a high encapsulation efficiency and good stability. **Conclusion:** Cinnamaldehyde liposomes with small particle size, high encapsulation efficiency and stable properties could be prepared by ethanol injection method.

Keywords: cinnamaldehyde; liposome; encapsulation efficiency; ethanol injection method

肉桂醛是一种从肉桂中提取的黄色黏性液体, 是肉桂精油的主要成分, 具有抑菌、抗氧化特性^[1-2]。肉桂醛具有典型香气, 直接加入食品中会有令人不适的气味, 降低食品的感官品质^[3], 但肉桂醛因水溶性低, 易挥发, 易氧化, 稳定性差, 在食品加工中的应用受限^[4]。采用微胶囊技术, 如脂质体、纳米乳和纳米粒等^[5]方法对肉桂醛进行预处理, 可以掩盖其不良风味, 避免或减轻其典型气味对加工食品感官品质的影响, 同时可以改善精油的溶解性和稳定性。

脂质体是由脂质分子在水溶液中形成的具有双分子层结构的囊泡, 可以同时包裹脂溶性物质和水溶性物质。脂质体在水中的分散性好、生物相容性高, 并且被脂质体包埋的物质扩散率低、释放缓慢^[6-8]。因此, 将活性物质包封到脂质体中可保留其功能活性并提高其在加工和贮藏过程中的稳定性^[9-10]。

乙醇注入法是一种将磷脂溶液注入到水相中, 无需添加有机溶剂, 且无任何中间过程即可快速形成脂质体的脂质体包埋优选方法。与其他方法相比, 该方法不仅可以避免使用有毒溶剂(如三氯甲烷、甲醇), 且得到的脂质体粒径更小、分散性更佳, 贮藏性能良好, 操作简便易行、重现性好^[11-14]。Sebaaly 等^[9]用乙醇注入法制备了包

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(编号: 31801506); 陕西省教育厅科研专项(编号: 20JK0550)

作者简介: 常大伟(1978—), 男, 陕西科技大学副教授, 博士。

E-mail: cdw1860@126.com

收稿日期: 2021-06-30

封率为 86.6% 的丁香精油脂质体,脂质体表现出纳米级的球形囊泡,贮存两个月后粒径从 (260.0 ± 4.8) nm 增加到 (367.0 ± 12.9) nm,包封率保持不变,具有一定的稳定性。Toniazzo 等^[15]研究表明,通过乙醇注入法制备的槲皮素脂质体,贮藏 100 d 后槲皮素浓度未下降,具有较长的保存期。

研究拟以肉桂醛为原料通过乙醇注入法制备肉桂醛脂质体,在单因素试验的基础上,以蛋黄卵磷脂质量浓度、蛋黄卵磷脂与胆固醇质量比、蛋黄卵磷脂与肉桂醛质量比为考察因素,以肉桂醛脂质体的包封率为响应值,采用响应面分析法,确定制备肉桂醛脂质体的最佳工艺。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 仪器与试剂

蛋黄卵磷脂:生化试剂,国药集团化学试剂有限公司;

胆固醇、吐温 80:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;

肉桂醛: $\geq 95\%$,阿拉丁试剂(上海)有限公司;

无水乙醇、正己烷:分析纯,天津市富宇精细化工有限公司。

1.1.2 主要仪器与设备

恒流泵:HL-2S 型,上海青浦沪西仪器厂;

旋转蒸发器:RE52CS-1 型,上海亚荣生化仪器厂;

紫外分光光度计:UV-1800 型,上海美普达仪器有限公司;

纳米粒度及 zeta 电位仪:Litesizer 500 型,奥地利安东帕公司。

1.2 方法

1.2.1 肉桂醛脂质体的制备 采用乙醇注入法^[16]。按一定质量比称取蛋黄卵磷脂、胆固醇和肉桂醛,加入 10 mL 无水乙醇,45 °C 水浴直至完全溶解,随后将有机相通过恒流泵注入到预热 45 °C 的 40 mL 水化介质中,置于磁力搅拌器上水化 30 min。通过旋转蒸发器除去无水乙醇(水浴温度 45 °C)。制备的脂质体在 4 °C 下保存。

1.2.2 单因素试验 分别研究蛋黄卵磷脂质量浓度(1, 2, 4, 6, 8 mg/mL),蛋黄卵磷脂与肉桂醛的质量比($m_{\text{蛋黄卵磷脂}} : m_{\text{肉桂醛}}$ 为 2 : 1, 4 : 1, 6 : 1, 8 : 1, 10 : 1),卵磷脂与胆固醇的质量比($m_{\text{蛋黄卵磷脂}} : m_{\text{胆固醇}}$ 为 2 : 1, 4 : 1, 6 : 1, 8 : 1, 10 : 1),乙醇注入速度(0.033 8, 0.071 9, 0.103 0, 0.133 0, 0.167 0 mL/s)4 个因素对脂质体包封率、粒径及多分散指数(PDI)的影响。各因素固定时的取值为磷脂质量浓度 2 mg/mL、 $m_{\text{蛋黄卵磷脂}} : m_{\text{肉桂醛}}$ 为 6 : 1、 $m_{\text{蛋黄卵磷脂}} : m_{\text{胆固醇}}$ 为 6 : 1、注射速度 0.133 0 mL/s。

1.2.3 响应面优化试验 根据单因素试验结果选取影响

较显著的 3 个因素为变量,包封率为响应值,设计三因素三水平的响应面优化试验。

1.2.4 贮藏稳定性试验 将制备好的肉桂醛脂质体置于常温 and 4 °C 条件下分别贮藏 0, 7, 14, 21, 28 d,测定其包封率的变化。

1.2.5 包封率及载量的测定

(1) 总肉桂醛标准曲线绘制:准确称取肉桂醛 11.4 mg,加入 1 mL 吐温 80—乙醇溶液 [$m_{\text{吐温80}} : V_{\text{乙醇}} = 1 : 10$ (g/mL)]使其溶解,加入 9 mL 水,摇匀。分别精确称取 10, 20, 30, 35, 40 μL 于 10 mL 容量瓶中,用吐温 80—乙醇溶液 [$m_{\text{吐温80}} : V_{\text{乙醇}} = 1 : 100$ (g/mL)]稀释至刻度,摇匀,于 287 nm 处测定吸光值,得到标准曲线。

(2) 游离肉桂醛标准曲线绘制:准确称取肉桂醛 14.9 mg 加入 10 mL 无水乙醇溶解,摇匀。分别量取 4, 5, 10, 20, 30 μL 上述溶液于 10 mL 容量瓶中,用无水乙醇稀释至刻度,摇匀,于 287 nm 处测定吸光值,得到标准曲线。

(3) 总肉桂醛含量测定:取 0.5 mL 肉桂醛脂质体于 10 mL 容量瓶中,加入 1 mL 吐温 80—乙醇溶液 [$m_{\text{吐温80}} : V_{\text{乙醇}} = 1 : 10$ (g/mL)],漩涡振荡 30 s 后加去离子水补足 10 mL,同法不加肉桂醛制作空白脂质体作为对照,于 287 nm 处测定吸光值。

(4) 游离肉桂醛含量测定:取 0.5 mL 肉桂醛脂质体,加入 3 mL 正己烷,漩涡振荡 2 min,3 000 r/min 离心 5 min,取上清液,重复上述步骤 2 次,将收集的上清液加入正己烷至 10 mL,同法以空白脂质体作对照,于 287 nm 处测定吸光值。分别按式(1)、式(2)计算肉桂醛的包封率和载量。

$$E_E = \frac{M_1 - M_2}{M_0} \times 100\%, \quad (1)$$

$$L_C = \frac{M_1 - M_2}{M_3} \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

E_E ——肉桂醛包封率,%;

L_C ——肉桂醛载量,%;

M_1 ——产品中肉桂醛总含量,mg;

M_2 ——游离肉桂醛含量,mg;

M_0 ——初始肉桂醛添加量,mg;

M_3 ——产品中的脂质含量,mg。

1.2.6 粒径、多分散指数(PDI)及 zeta 电位的测定 用蒸馏水将样品稀释 10 倍后取适量样品于样品池中,使用纳米粒度及 zeta 电位仪分别测定其粒径、PDI 及 zeta 电位。

1.3 数据分析

使用 Design-Expert 8.0.6 和 Excel 软件进行数据分析,使用 Origin 2021 软件作图。

2 结果与分析

2.1 肉桂醛标准曲线

由图 1 可知,总肉桂醛标准曲线为 $y = 0.192\ 2x - 0.057\ 8$, $R^2 = 0.992\ 3$,线性质量浓度范围为 $1.143 \sim 4.571\ \mu\text{g/mL}$ 。游离肉桂醛标准曲线为 $y = 0.185\ 3x + 0.024\ 5$, $R^2 = 0.994\ 6$,线性质量浓度范围为 $0.059\ 6 \sim 5.960\ 0\ \mu\text{g/mL}$ 。

2.2 单因素试验

2.2.1 蛋黄卵磷脂与胆固醇质量比对脂质体的影响 由图 2(a)可知,随蛋黄卵磷脂与胆固醇质量比值增大,肉桂醛脂质体的包封率呈先增大后减小趋势,当 $m_{\text{蛋黄卵磷脂}} : m_{\text{胆固醇}}$ 为 $6 : 1$ 时,包封率达到最大。由图 2(b)可知,随蛋黄卵磷脂与胆固醇质量比值增大,粒径呈先减小后增大趋势, PDI 均小于 0.3 , 粒径较均匀分布。这是由于在磷脂双层中,胆固醇分子通过磷脂的脂性酰基链的羰基与胆固醇羟基头之间的氢键相互作用,保持着与磷脂分子处于平行排列的位置^[13]。这种相互作用降低了磷脂双层中分子流动性,增强了膜的刚性和致密度,在水合过程中提高了脂质体膜的稳定性,因此在适当范围内增加胆固醇

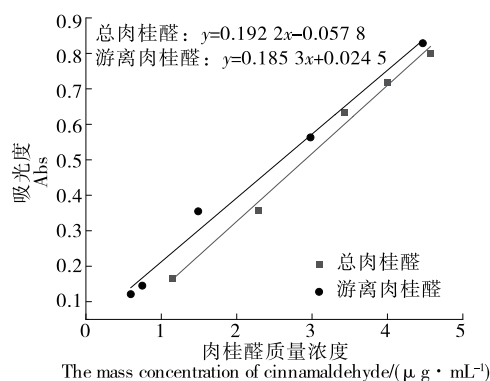


图 1 肉桂醛标准曲线

Figure 1 Standard curve of cinnamaldehyde

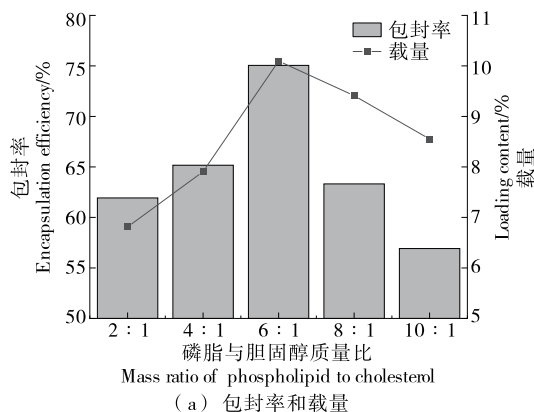


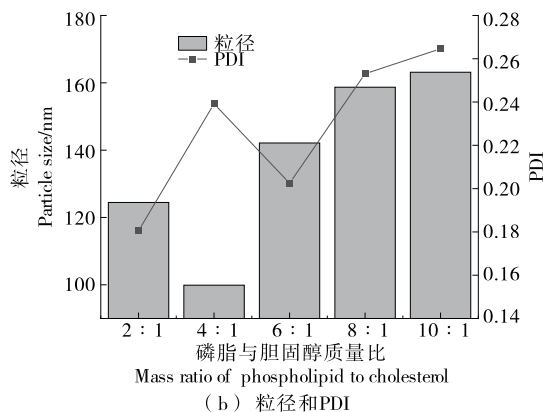
图 2 磷脂与胆固醇质量比对脂质体包封率、载量、粒径及 PDI 的影响

Figure 2 Effect of mass ratio of phospholipid to cholesterol on liposome encapsulation efficiency, loading content, particle size and PDI

含量会增加肉桂醛的包封率,同时减小脂质体的聚集,减小了脂质体的粒径。而当胆固醇量过多时,嵌入脂质双层的胆固醇增多,会降低肉桂醛插入的空间,同时胆固醇也具有一定的乳化性,当胆固醇比例过大时,反而不利于脂质体膜的形成,只会增大脂质体的粒径,降低肉桂醛的包封率^[17-18]。因此,当 $m_{\text{蛋黄卵磷脂}} : m_{\text{胆固醇}}$ 为 $6 : 1$ 时,肉桂醛包封率与载量达到最大,粒径较小,体系稳定,这与 Yuan 等^[19]的研究结果一致。

2.2.2 蛋黄卵磷脂质量浓度对脂质体的影响 由图 3(a)可知,过高或过低的蛋黄卵磷脂质量浓度均导致肉桂醛包封率下降。由图 3(b)可知,随着蛋黄卵磷脂质量浓度的增加,粒径呈增大趋势, PDI 呈先减小后增大趋势,与 Jaafar-Maalej 等^[20]的研究结果一致。这是由于注射溶液中的磷脂浓度越低,所形成脂质体的粒径越低,当磷脂乙醇溶液注入到水相中时,脂质分子聚集并形成被称为“双层磷脂片段(BPFs)”的中间结构,随磷脂浓度增加,所形成的 BPFs 的浓度也会增加,因此提高了它们的聚结机率,并增加了较大脂质体形成的可能性^[21]。当蛋黄卵磷脂质量浓度为 $2\ \text{mg/mL}$ 时,脂质体的包封率和载量均达到最大,粒径及 PDI 较低。

2.2.3 蛋黄卵磷脂与肉桂醛质量比对脂质体的影响 由图 4(a)可知,随肉桂醛含量增加,包封率呈先增大后减小趋势,载量呈上升趋势,与 Yuan 等^[19]的研究结果一致。当 $m_{\text{蛋黄卵磷脂}} : m_{\text{肉桂醛}}$ 为 $6 : 1$ 时,包封率达到最大值。一定数量的脂质体对肉桂醛的承载能力有限,所以当肉桂醛添加量较低时,脂质体有足够的空间来容纳肉桂醛,导致其包封率较高,继续增加肉桂醛含量,超过脂质体的负荷,包封率反而下降^[22]。由图 4(b)可知,当肉桂醛添加量增多时,脂质体粒径不断增大,可能是由于亲脂性化合物在膜的疏水性部分的积累会干扰磷脂之间的相互作用,导致双分子层膨胀^[9]。各个条件下 PDI 均小于 0.3 , 且无明显变化。因此,综合考虑选择蛋黄卵磷脂与肉桂



醛质量比为 6 : 1。

2.2.4 注射速度对脂质体的影响 由图 5(a)可知,注射速率对脂质体的包封率无显著影响。无论乙醇的注入速度如何,均能引起磷脂在水相的快速扩散,并逐渐形成脂

质体,而不会影响磷脂/胆固醇对肉桂醛的包封^[23]。由图 5(b)可知,随注射速度增加,脂质体粒径不断减小,这主要是因为速度越快,磷脂双分子层结合越快,越有可能形成小的脂质体囊泡^[24]。PDI 均小于 0.3,说明在此条

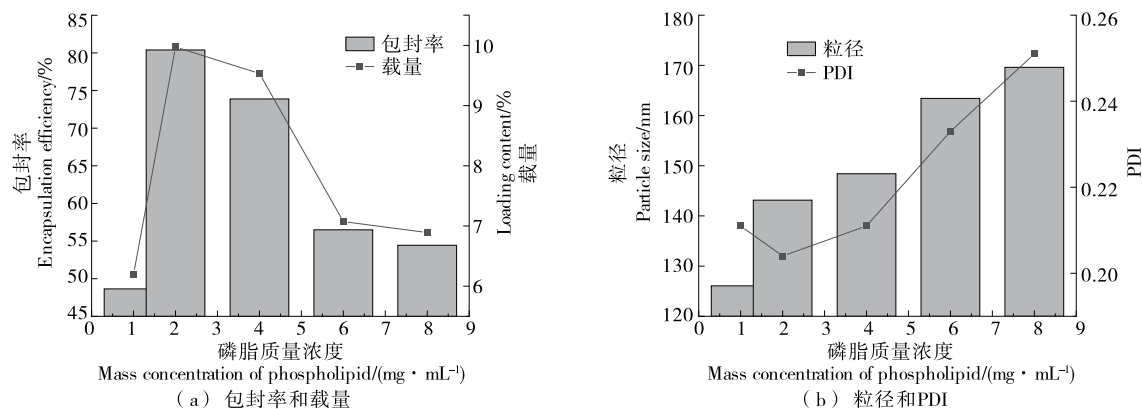


图 3 磷脂质量浓度对脂质体包封率、载量、粒径及 PDI 的影响

Figure 3 Effect of mass concentration of phospholipid on liposome encapsulation efficiency, loading content, particle size and PDI

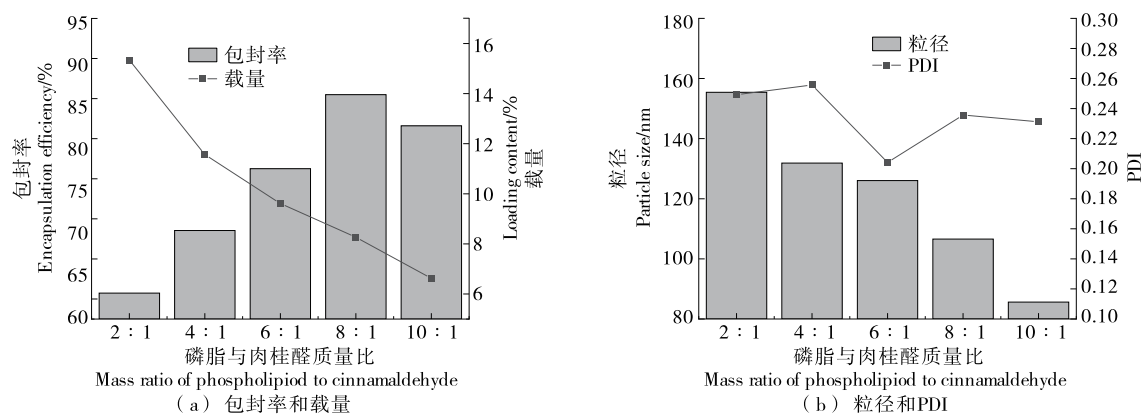


图 4 磷脂与肉桂醛质量比对脂质体包封率、载量、粒径及 PDI 的影响

Figure 4 Effect of mass ratio of phospholipid to cinnamaldehyde on liposome encapsulation efficiency, loading content, particle size and PDI

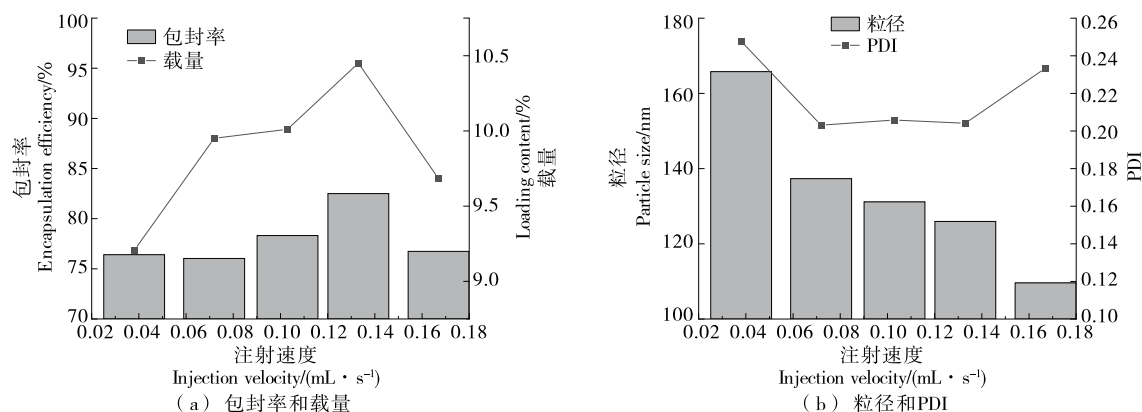


图 5 注射速度对脂质体包封率、载量、粒径及 PDI 的影响

Figure 5 Effect of injection velocity on liposome encapsulation efficiency, loading content, particle size and PDI

件下,脂质体均一性良好。

2.3 响应面试验

2.3.1 响应面试验设计与结果 根据单因素试验结果,以对肉桂醛脂质体包封率影响较大的磷脂浓度、磷脂与胆固醇质量比、磷脂与肉桂醛质量比为响应变量(表 1),脂质体包封率(Y)为响应值。不同试验条件下脂质体包封率如表 2 所示。

对响应面结果进行回归拟合,得到包封率与各因素的二次回归方程:

$$Y = 85.25 + 4.12A - 1.07B + 4.69C - 2.02AB + 2.32AC + 2.17BC - 19.98A^2 - 2.61B^2 - 6.54C^2。$$
 (3)

表 1 响应面设计试验因素及水平

Table 1 Response surface design experimental factors and levels

水平	A 蛋黄卵磷脂质量浓度/(mg·mL ⁻¹)	B 蛋黄卵磷脂与胆固醇的质量比	C 蛋黄卵磷脂与肉桂醛的质量比
-1	1.0	4	4
0	2.5	6	6
1	4.0	8	8

表 2 响应面试验的设计和结果

Table 2 Design and results of response surface experiment

试验号	A	B	C	Y/%
1	0	1	-1	66.77
2	1	0	0	63.75
3	0	0	0	82.01
4	0	1	1	79.35
5	-1	0	-1	53.21
6	1	-1	0	71.19
7	0	0	0	82.09
8	-1	-1	0	58.17
9	1	0	1	69.04
10	-1	0	1	57.37
11	0	-1	1	73.92
12	-1	1	0	57.54
13	1	0	-1	55.30
14	0	0	0	80.19
15	0	0	0	81.65
16	0	-1	-1	70.01
17	0	0	0	82.34

2.3.2 回归模型方差分析 由表 3 可知,回归模型的 P 值显著(P<0.05),而失拟项不显著(P>0.05),说明模型是精确和适用的。二次回归模型决定系数 R²=0.991 8,表明该模型在试验变量范围内具有极高的拟合能力。各因素对肉桂醛脂质体包封率的影响大小为:C>A>B。在该表中,线性系数(A、C)、二次项系数(A²、B²、C²)和相互作用系数(AB、AC、BC)对包封率有显著影响(P<0.05)。

表 3 回归模型及方差分析[†]

Table 3 Regression model and variance analysis

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	1 772.78	9	196.98	94.39	<0.000 1	* *
A	136.04	1	136.04	65.19	<0.000 1	* *
B	8.72	1	8.72	4.18	0.080 2	
C	166.90	1	166.90	79.98	<0.000 1	* *
AB	17.19	1	17.19	8.24	0.024 0	*
AC	22.82	1	22.82	10.93	0.013 0	*
BC	18.79	1	18.79	9.01	0.019 9	*
A ²	1 255.06	1	1 255.06	601.44	<0.000 1	* *
B ²	28.58	1	28.58	13.70	0.007 6	* *
C ²	179.98	1	179.98	86.25	<0.000 1	* *
残差	14.61	7	2.09			
失拟项	11.68	3	11.68	5.31	0.070 2	
净误差	2.93	4	0.73			
总和	1 787.39	16				

[†] * 表示 P<0.05; * * 表示 P<0.01。

2.3.3 响应面优化与分析 由图 6 可知,A 与 C 的交互作用较明显,曲面凸起较大,对包封率的影响较大,而 B 与 C 对包封率的影响较小。通过响应面分析得到最佳制备条件为:磷脂质量浓度 2.69 mg/mL、m_{蛋黄卵磷脂}:m_{肉桂醛}为 6.73:1.00 和 m_{蛋黄卵磷脂}:m_{胆固醇}为 5.79:1.00。在此条件下,制备的肉桂醛脂质体包封率为 82.37%,粒径为 113.89 nm,PDI 为 0.2,与模型相符。

2.4 贮藏稳定性试验

由图 7 可知,随贮藏时间延长,脂质体包封率不断下降,贮藏 28 d 后,在常温下,包封率从 78.9%下降到 57.5%,在 4℃时,包封率从 78.0%下降到 70.7%,肉桂醛在常温下比 4℃时溶出更快,主要是因为常温下脂质体膜有更高的渗透率,导致肉桂醛从脂质体的疏水区域释放出来^[25],低温下包封率较高可能是由于膜的通透性的降低,以及低温下磷脂分子迁移率的降低,在 4℃贮藏条件下,脂质体在 28 d 后仍有较高的包封率。

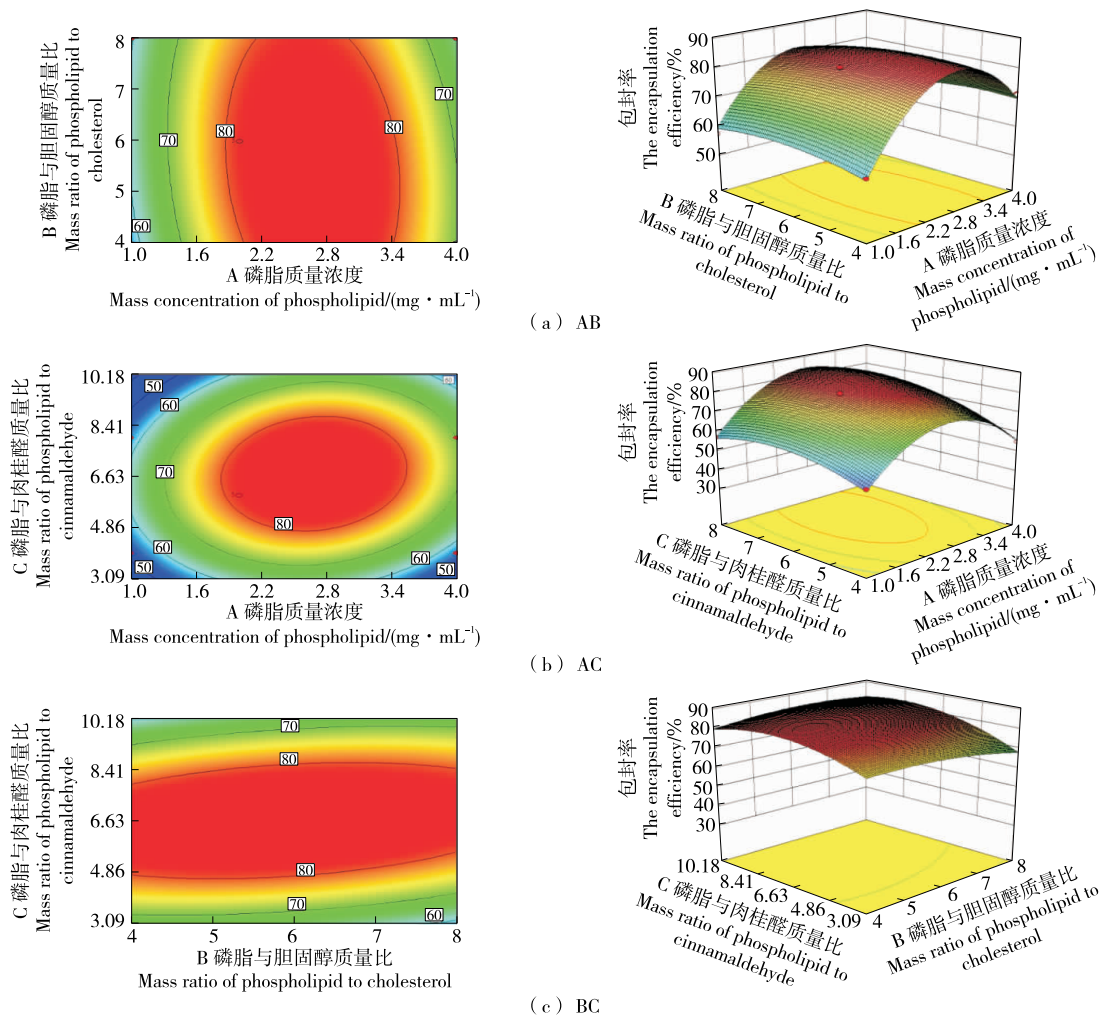


图 6 各参数交互作用对包封率的影响

Figure 6 The influence of interaction of different factors on encapsulation efficiency

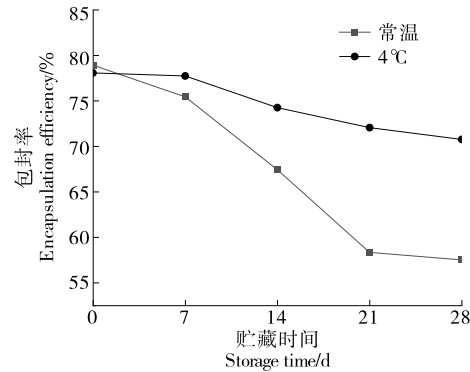


图 7 不同温度下肉桂醛脂质体的贮藏稳定性

Figure 7 Storage stability of cinnamaldehyde liposomes at different temperatures

3 结论

在单因素试验的基础上通过响应面对肉桂醛脂质体的制备工艺进行优化,结果表明,最佳的工艺条件为磷

脂质量浓度 2.69 mg/mL, $m_{\text{磷脂}} : m_{\text{肉桂醛}}$ 为 6.73 : 1.00 以及 $m_{\text{磷脂}} : m_{\text{胆固醇}}$ 为 5.79 : 1.00,在此条件下制得肉桂醛脂质体的包封率为 82.37%,粒径为 113.89 nm,多分散指数为 0.20,zeta 电位为 -29.07 mV。响应面优化的二次模型可以较好地预测肉桂醛脂质体的制备条件和包封率之间的关系。贮藏试验表明,在 4℃下比在常温下贮藏具有更高的稳定性,贮藏 28 d 后,在 4℃下贮藏的脂质体仍有较高的包封率。试验证明经乙醇注入法制备的脂质体具有较高的包封率,粒径较小,分布均匀,并且在一定贮藏时间下仍有较高的包封率。尽管如此,脂质体在体内和体外的稳定性仍然存在一定问题,因为在贮藏期间或给药后,脂质体倾向于降解或聚合,而导致包合物的泄漏。为了克服这些问题,后续将采用聚合物对脂质体的表面进行修饰以提高其环境的适应性。

参考文献

[1] LOPEZ-MATA M A, RUIZ-CRUZ S, ORNELAS-PAZ J D, et al.

- Mechanical, barrier and antioxidant properties of chitosan films incorporating cinnamaldehyde[J]. *Journal of Polymers and the Environment*, 2018, 26(2): 452-461.
- [2] MUNHUWEYI K, CALEB O J, VAN REENEN A J, et al. Physical and antifungal properties of β -cyclodextrin microcapsules and nanofibre films containing cinnamon and oregano essential oils[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2018, 87: 413-422.
- [3] HILL L E, GOMES C, TAYLOR T M. Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing essential oils (trans-cinnamaldehyde, eugenol, cinnamon bark, and clove bud extracts) for antimicrobial delivery applications [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2013, 51(1): 86-93.
- [4] LIU F, TURKER SARICAOGLU F, AVENA-BUSTILLOS R J, et al. Preparation of fish skin gelatin-based nanofibers incorporating cinnamaldehyde by solution blow spinning[J]. *International Journal of Molecular Science*, 2018, 19(2): 618.
- [5] ACEVEDO-FANI A, SALVIA-TRUJILLO L, ROJAS-GRAU M A, et al. Edible films from essential-oil-loaded nanoemulsions: Physicochemical characterization and antimicrobial properties[J]. *Food Hydrocolloids*, 2015, 47: 168-177.
- [6] VAN TRAN V, MOON J Y, LEE Y C. Liposomes for delivery of antioxidants in cosmeceuticals: Challenges and development strategies[J]. *Journal of Controlled Release*, 2019, 300: 114-140.
- [7] TAI K, RAPPOLT M, HE X, et al. Effect of beta-sitosterol on the curcumin-loaded liposomes: Vesicle characteristics, physicochemical stability, in vitro release and bioavailability[J]. *Food Chemistry*, 2019, 293: 92-102.
- [8] WU Z, ZHOU W, PANG C, et al. Multifunctional chitosan-based coating with liposomes containing laurel essential oils and nanosilver for pork preservation[J]. *Food Chemistry*, 2019, 295: 16-25.
- [9] SEBAALY C, JRAIJ A, FESSI H, et al. Preparation and characterization of clove essential oil-loaded liposomes[J]. *Food Chemistry*, 2015, 178: 52-62.
- [10] 焦岩, 李大婧, 刘春泉, 等. 叶黄素纳米脂质体的制备工艺优化及其氧化稳定性[J]. *食品科学*, 2012, 38(18): 259-265.
- JIAO Yan, LI Da-jing, LIU Chun-quan, et al. Lutein nanoliposomes: Optimization of preparation conditions and oxidative stability[J]. *Food Science*, 2012, 38(18): 259-265.
- [11] BAI C, LUO G, LIU Y, et al. A comparison investigation of coix-seed oil liposomes prepared by five different methods[J]. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 2014, 36(1): 136-145.
- [12] JUSTO O R, MORAES A M. Economical feasibility evaluation of an ethanol injection liposome production plant[J]. *Chemical Engineering & Technology*, 2010, 33(1): 15-20.
- [13] 许时婴, 张晓鸣, 夏书芹. 微胶囊技术: 原理与应用[M]. 北京: 北京化学工业出版社, 2006: 96-97.
- XU Shi-ying, ZHANG Xiao-ming, XIA Shu-qin. Microencapsulation technology: Principles and applications[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2006: 96-97.
- [14] 尹浩, 陈娅, 陶涛, 等. 莲房原花青素低聚体纳米脂质体的制备及其稳定性、抗氧化性分析[J]. *食品科学*, 2018, 39(10): 97-105.
- YIN Hao, CHEN Ya, TAO Tao, et al. Preparation, stability and antioxidant activity of lotus seedpod oligomeric procyanidin nanoliposome[J]. *Food Science*, 2018, 39(10): 97-105.
- [15] TONIAZZO T, PERES M S, RAMOS A P, et al. Encapsulation of quercetin in liposomes by ethanol injection and physicochemical characterization of dispersions and lyophilized vesicles[J]. *Food Bioscience*, 2017, 19: 17-25.
- [16] XIA S, TAN C, XUE J, et al. Chitosan/tripolyphosphate-nanoliposomes core-shell nanocomplexes as vitamin E carriers: Shelf-life and thermal properties[J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2014, 49(5): 1367-1374.
- [17] MIAO Z L, DENG Y J, DU H Y, et al. Preparation of a liposomal delivery system and its in vitro release of rapamycin[J]. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2015, 9(3): 941-946.
- [18] GUO D, LIU J, FAN Y, et al. Optimization, characterization and evaluation of liposomes from *Malus hupehensis* (Pamp.) Rehd. extracts[J]. *Journal of Liposome Research*, 2020, 30(4): 366-376.
- [19] YUAN J, LU Y, ABULA S, et al. Optimization on preparation condition of propolis flavonoids liposome by response surface methodology and research of its immunoenhancement activity[J]. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2013(3): 505703.
- [20] JAAFAR-MAALEJ C, DIAB R, ANDRIEU V, et al. Ethanol injection method for hydrophilic and lipophilic drug-loaded liposome preparation[J]. *Journal of Liposome Research*, 2010, 20(3): 228-243.
- [21] YANG K, DELANEY J T, SCHUBERT U S, et al. Fast high-throughput screening of temoporfin-loaded liposomal formulations prepared by ethanol injection method[J]. *Journal of Liposome Research*, 2012, 22(1): 31-41.
- [22] LU Q, LU P M, PIAO J H, et al. Preparation and physicochemical characteristics of an allicin nanoliposome and its release behavior[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2014, 57(2): 686-695.
- [23] SONG J, SHI F, ZHANG Z, et al. Formulation and evaluation of celastrol-loaded liposomes[J]. *Molecules*, 2011, 16: 7880-7892.
- [24] GOUDA A, SAKR O S, NASR M, et al. Ethanol injection technique for liposomes formulation: An insight into development, influencing factors, challenges and applications[J]. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2020, 61: 102174.
- [25] JIN H H, LU Q, JIANG J G. Curcumin liposomes prepared with milk fat globule membrane phospholipids and soybean lecithin[J]. *Journal of Dairy Science*, 2016, 99(3): 1780-1790.