

双层多糖修饰核桃多肽脂质体的制备及表征

陈睿^{1,2} 王丰俊^{1,2} 张国红^{1,2} 金凤^{1,2} 彭红春³

(1. 北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083; 2. 林业食品加工与安全北京市重点实验室, 北京 100083;
3. 新疆美嘉食品饮料有限公司, 新疆喀什 844900)

摘要: [目的] 提高核桃多肽脂质体(WP-L)的理化稳定性, 延缓核桃多肽(WP)释放, 并利用海藻酸钠(SA)和壳聚糖(CS)对 WP-L 进行双层多糖修饰。[方法] 考察不同质量分数的 CS 与 SA 修饰对 WP-L 理化性质的影响, 采用透射电子显微镜(TEM)与傅里叶变换红外光谱(FTIR)表征脂质体结构形态, 并考察长期贮藏条件下的脂质体稳定性, 最后通过体外模拟胃肠消化与释放试验评估多肽释放率、释放行为、缓释特性及消化前后的生物活性变化。[结果] 当 CS 与 SA 质量分数分别为 0.6% 和 0.5% 时, 制备的海藻酸钠—壳聚糖核桃多肽脂质体(SA-CS-WP-L)对核桃多肽的包封率达 90.67%, ζ -电位为 -17.10 mV。TEM 观察结果表明, SA-CS-WP-L 呈现球形囊泡结构, 表面光滑, 且存在核—壳结构, TEM 图像的衬度发生改变表明 CS 与 SA 成功沉积在核桃多肽脂质体表面。FTIR 结果显示, SA 与 CS 在核桃多肽脂质体表面通过疏水相互作用和分子间氢键作用形成稳定的复合物。在 19 d 低温贮藏试验中, SA-CS-WP-L 仍展现出较高的多肽包封率(70.77%)和稳定的理化特性。体外模拟胃肠消化试验和多肽体外释放试验结果表明, SA 和 CS 修饰可有效延缓核桃多肽在消化过程中的释放, 并维持其长效血管紧张素转化酶(ACE)抑制效能。此外, 核桃多肽展现出 Fick 扩散的释放行为。[结论] 利用海藻酸钠和壳聚糖对核桃多肽脂质体进行双层表面修饰, 能够有效保护核桃多肽并实现良好的缓释效果。

关键词: 核桃多肽脂质体; 双层多糖修饰; 体外模拟胃肠消化; 缓释特性; 海藻酸钠; 壳聚糖

Preparation and characterization of walnut polypeptide liposomes with bilayer polysaccharide modification

CHEN Rui^{1,2} WANG Fengjun^{1,2} ZHANG Guohong^{1,2} JIN Feng^{1,2} PENG Hongchun³

(1. School of Biological Sciences and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China;
2. Beijing Key Laboratory of Forestry Food Processing and Safety, Beijing 100083, China;
3. Xinjiang Meijia Food and Beverage Co., Ltd., Kashi, Xinjiang 844900, China)

Abstract: [Objective] To improve the physicochemical stability of walnut polypeptide liposomes (WP-L), delay walnut polypeptide (WP) release, and conduct bilayer polysaccharide modification on the WP-L using sodium alginate (SA) and chitosan (CS). [Methods] The effects of modifications by CS and SA in different mass fractions on the physicochemical properties of WP-L are investigated. Then, the structural morphology of the liposomes is characterized by transmission electron microscopy (TEM) and Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. Additionally, liposome stability under long-term storage conditions is examined. Finally, polypeptide release rates, release behavior, sustained-release characteristics, alongside bioactivity changes before and after digestion are evaluated via *in vitro* simulations of gastrointestinal digestion and release experiments. [Results] When the mass fractions of CS and SA are 0.6% and 0.5%, respectively, the encapsulation efficiency of WP by the prepared SA-CS-WP-L is up to 90.67%, with a ζ -potential of -17.10 mV. According to TEM

基金项目: 新疆维吾尔自治区重大科技专项(编号: 2022A02009-4); 新疆维吾尔自治区第三批“天池英才”引进计划项目(编号: XJTCKS202526); 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(编号: BFUKF202515)

通信作者: 王丰俊(1975—), 男, 北京林业大学教授, 博士。E-mail: wangfengjun@bjfu.edu.cn

收稿日期: 2025-12-15 **改回日期:** 2026-03-04

引用格式: 陈睿, 王丰俊, 张国红, 等. 双层多糖修饰核桃多肽脂质体的制备及表征[J]. 食品与机械, 2026, 42(3): 1-12.

Citation: CHEN Rui, WANG Fengjun, ZHANG Guohong, et al. Preparation and characterization of walnut polypeptide liposomes with bilayer polysaccharide modification[J]. Food & Machinery, 2026, 42(3): 1-12.

observation, SA-CS-WP-L exhibits a spherical vesicle structure with a smooth surface and a core-shell structure. Changes in TEM image contrast indicate successful deposition of CS and SA onto the WP-L surface. In FTIR results, SA and CS form stable complexes on the WP-L surface through hydrophobic interactions and intermolecular hydrogen bonding. During the 19-day low-temperature storage experiment, SA-CS-WP-L still exhibits a high polypeptide encapsulation efficiency (70.77%) and stable physicochemical properties. *In vitro* gastrointestinal digestion simulations and polypeptide release assays demonstrate that SA and CS modifications effectively delay WP release during digestion while maintaining their sustained inhibitory efficacy against angiotensin-converting enzyme (ACE). Furthermore, WP release follows Fick diffusion behavior. [Conclusion] Bilayer surface modification of WP-L using SA and CS effectively protects WP and achieves sustained-release performance.

Keywords: walnut polypeptide liposome; bilayer polysaccharide modification; *in vitro* simulated gastrointestinal digestion; sustained-release property; sodium alginate; chitosan

核桃(*Juglans regia* L.)是世界上主要的坚果和木本粮油资源,与扁桃、腰果、榛子并称为世界著名的“四大干果”^[1]。其富含脂肪、蛋白质、矿物质等营养成分及多种生物活性物质,具有健脑益智、调节免疫及降低心血管疾病风险等功效^[2-3]。近年来,由富含蛋白质的核桃粕经高值化利用生产的核桃多肽(WP),因其完整保留了核桃蛋白中的必需氨基酸并富含生物活性肽,已成为研究热点^[4-5]。核桃蛋白经酶解生成的核桃多肽不仅具有低相对分子质量、高溶解性等特点,还具有血管紧张素转化酶(ACE)抑制活性、抗氧化活性、抗肿瘤等多种生物活性^[6-7]。然而,生物活性物质需经消化道的复杂环境方能抵达靶器官发挥效能,此过程易受到 pH 条件和胃肠道中的酶降解的影响导致生物利用度降低^[8]。此外,核桃多肽具有较强的吸湿性,限制了其在功能性食品中的应用。

脂质体是由磷脂自组装形成的囊泡状结构,其独特的亲水核心——疏水夹层双分子层结构,能够有效包埋活性成分,具有优异的靶向递送、控释能力以及良好的可修饰性、生物相容性^[9-10]。Luo 等^[10]制备了以羟基磷灰石为载体的核桃肽前脂质体,发现添加羟基磷灰石可提高核桃肽前脂质体的热降解稳定性和环境稳定性,并在模拟体外消化中展现出显著的核桃肽缓释效果。Cao 等^[11]将 ACE 抑制肽封装至采用壳聚糖(CS)修饰的纳米脂质体中,使核桃多肽包封率提升至 76.13%,并在贮藏过程中有效保护了抗氧化活性和 ACE 抑制活性。尽管脂质体在一定程度上可以改善核桃多肽的物理稳定性,提高生物利用度并有效保留生物活性,但传统脂质体易受氧化、化学和酶反应的破坏而发生破裂或融合,且在贮藏期间易发生絮凝和聚集,造成生物活性物质释放不稳定或发生泄露^[12]。壳聚糖、海藻酸钠(SA)可以通过静电相互作用聚集在磷脂表层^[13],形成致密的网络结构,不仅可以有效提升脂质体的物理化学稳定性,还有助于实现活性成分的靶向释放,从而在食品工业中展现出较大的应用潜力。Wang 等^[12]制备了 SA 和 CS 共修饰的脂质体用于姜黄素的包封与缓释,成功将包封率提升至 92.4%,姜黄素生物可及性较未修饰的提高了 1.32 倍。

试验拟采用薄膜分散法制备核桃多肽脂质体(WP-L),并将其作为初始脂质体,通过聚电解质沉积作用,将 SA 和 CS 自组装至 WP-L 表面,形成保护层。探究 SA 和 CS 的质量分数对包封率、 ζ -电位、粒径与多分散指数(PDI)的影响,确定最佳制备工艺;利用透射电子显微镜(TEM)、傅里叶变换红外光谱(FTIR)进行表征,揭示 WP-L 包封与多糖作用的机理及效果;随后开展中低温连续贮藏试验考察其稳定性,并分析不同修饰条件下 WP-L 的消化稳定性和体外释放特性,旨在进一步验证多糖修饰对脂质体封装核桃多肽的保护效果,为评估消化前后核桃多肽的生物活性保留情况提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

核桃多肽:相对分子质量 <5 kDa,自制;

无水氯化钙、酒石酸钾、五水硫酸铜、铁氰化钾、三氯化铁、溴化钾:分析纯,天津市光复科技发展有限公司;

牛血清白蛋白、吐温 80、海藻酸钠(超低黏度型)、3 种规格磷酸盐缓冲液(0.01 mmol/L, pH 7.4; 0.2 mol/L, pH 6.6; 0.2 mol/L, pH 7.0)、硼酸盐缓冲液(0.01 mol/L, pH 8.3)、猪胆盐(胆酸含量 $\geq 60\%$)、胃蛋白酶(3 000 U/mg)、胰酶(130 U/mg):分析级,上海麦克林生化科技有限公司;

福林酚、马尿酸—组胺酰—亮氨酸、曲拉通 X-100、大豆卵磷脂(磷脂酰胆碱 $>90\%$)、胆固醇、壳聚糖(脱乙酰度 $\geq 85\%$)、1,1-二苯基-2-苦基肼(DPPH):分析级,上海源叶生物有限公司;

氢氧化钠、盐酸、三氯乙酸、乙酸、无水乙醇:分析纯,天津市永大化学试剂有限公司;

乙腈、三氟乙酸:色谱纯,天津市永大化学试剂有限公司;

醋酸双氧铈:分析纯,上海雅吉生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

超声细胞破碎仪:Biosafer650-92 型,南京赛飞生物科技有限公司;

紫外可见分光光度计:L6 型,上海仪电分析仪器有限公司

限公司;

纳米粒径及电位分析仪:Litesizer 500型,奥地利安东帕有限公司;

傅里叶变换红外成像光谱仪:Nicolet iS50型,赛默飞世尔科技有限公司;

透射电镜:H-7650型,日本 HITACHI 公司;

水浴恒温振荡器:SHA-A型,天津赛得利斯实验分析仪器制造厂;

台式离心机:H/T16MM型,湖南赫西仪器装备有限公司;

超滤离心管:Millipore 15 mL/30 kDa,北京索莱宝科技有限公司;

高效液相色谱仪:LC-2010A HT型,日本岛津公司;

BaseLine C₁₈ 色谱柱:250 mm×4.6 mm,5 μm,天津倍思乐色谱技术开发中心。

1.3 试验方法

1.3.1 样品制备

(1) 储备液制备:用1%乙酸溶液、蒸馏水分别制备1%壳聚糖和1%海藻酸钠储备液,混匀后搅拌12 h,水浴超声0.5 h(超声频率40 kHz,温度25℃),4 000×g离心20 min,收集上清液并过0.22 μm滤膜,调节pH为5.5。

(2) 粗核桃多肽脂质体溶液制备:参照Liu等^[14]的方法并修改。将大豆卵磷脂、胆固醇和吐温80按质量比6:1:1溶于10 mL无水乙醇中,60℃水浴搅拌3 min,60℃、60 r/min旋转蒸发20 min形成干燥薄膜。向薄膜中加入10 mL磷酸盐缓冲液(0.01 mol/L,pH 7.4,含0.02 g核桃多肽),60℃水合1 h,4℃下超声8 min(频率20 kHz;功率500 W;间隔2 s循环工作)得到纳米级WP-L,于4℃静置12 h以稳定脂质体溶液。

(3) 壳聚糖-核桃多肽脂质体(CS-WP-L)制备:用1%乙酸溶液将壳聚糖储备液分别稀释为质量分数为0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%溶液。取2 mL稀释液,逐滴加入等量WP-L溶液,边滴边搅拌,继续搅拌1 h,形成CS-WP-L溶液,调节pH至5.5,于4℃静置12 h。

(4) 海藻酸钠-壳聚糖核桃多肽脂质体(SA-CS-WP-L)制备:用蒸馏水将海藻酸钠储备液分别稀释为质量分数为0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%溶液。取2 mL稀释液,逐滴加入等量CS-WP-L溶液,其余步骤同1.3.1(3),制备SA-CS-WP-L溶液。

1.3.2 包封率测定 参照贺建华等^[15]的方法绘制牛血清白蛋白标准曲线。采用超滤膜过滤一间接法测定核桃多肽质量浓度。向试管中加入0.5 mL脂质体和1 mL质量分数为0.06%的曲拉通X-100溶液,涡旋振荡30 s。取0.5 mL上述溶液代替标准液,后续试剂添加体积参照标准曲线,测得核桃多肽总质量浓度。取4 mL样品置于超

滤离心管,4 000 r/min离心20 min,得到的下层液体为游离核桃多肽液。取0.5 mL下层液体代替标准液,后续试剂添加体积参照标准曲线,测得游离肽质量浓度。按式(1)计算核桃多肽包封率。

$$B = \frac{C_0 - C_1}{C_0} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

B——核桃多肽包封率,%;

C₀——核桃多肽总质量浓度,mg/mL;

C₁——游离核桃多肽质量浓度,mg/mL。

1.3.3 ζ-电位、粒径与PDI 参照方顺翔^[16]的方法。

1.3.4 结构性质

(1) FTIR分析:参照Sarabandi等^[17]的方法。

(2) TEM表征:参照Ramezanzade等^[18]的方法。

1.3.5 贮藏稳定性 参照Liu等^[19]的方法并修改。将脂质体样品溶液分别于4、25℃贮藏0、5、12、19 d,测定样品的EE、粒径和ζ-电位。

1.3.6 脂质体胃肠消化稳定性 参照INFOGEST 2.0标准化静态体外消化方法制备模拟液^[20]。模拟胃肠消化前,将模拟胃液(SGF)与模拟肠液(SIF)于37℃、120 r/min振荡20 min。消化试验参照Liu等^[14]的方法并修改。将WP、WP-L、CS-WP-L和SA-CS-WP-L样品溶液与SGF按体积比1:1混匀,37℃、120 r/min水浴消化2 h。胃消化结束后,迅速使用0.5 mol/L氢氧化钠溶液将pH调至6.8,并将胃消化产物与SIF按体积比1:1混匀,继续消化2 h,沸水浴5 min灭酶。消化期间每隔30 min取样测定核桃多肽质量浓度,并按式(2)计算累计释放率。

$$Q = \frac{V_e \sum_{i=1}^{t-1} C_i + V_0 C_t}{m_0} \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

Q——核桃多肽累计释放率,%;

V_e——取样体积,mL;

V₀——总体积,mL;

C_i、C_t——不同释放时间溶液中核桃多肽质量浓度,mg/mL;

m₀——脂质体中包埋的核桃多肽质量,mg。

1.3.7 释放动力学分析 采用多种药物释放数学模型(零级、一级、Ritger-Peppas、Higuchi与Hixon-Crowell方程模型)研究体外核桃多肽释放机制^[21]。根据回归分析得到相关系数(R²),确定拟合释放数据最佳模型,相关计算式见式(3)~式(7)。

$$\text{零级模型: } \frac{M_t}{M_\infty} = k_0 t, \quad (3)$$

$$\text{一级模型: } \frac{M_t}{M_\infty} = 1 - e^{-k_1 t}, \quad (4)$$

$$\text{Ritger-Peppas 模型: } \frac{M_t}{M_\infty} = k_2 t^n, \quad (5)$$

$$\text{Higuchi 模型: } \frac{M_t}{M_\infty} = k_3 t^{1/2}, \quad (6)$$

$$\text{Hixon-Crowell 模型: } \frac{M_t}{M_\infty} = k_4 t^3 + k_5 t^2 + k_6 t, \quad (7)$$

式中:

M_t —— t 时累计释放量, mg/mL;

M_∞ —— ∞ 时累计释放量, mg/mL;

M_t/M_∞ —— t 时累计释放率, %;

k_0 ——零级方程扩散系数;

k_1 ——一级方程扩散系数;

k_2 ——Ritger-Peppas 方程扩散系数;

k_3 ——Higuchi 方程扩散系数;

k_4, k_5, k_6 ——Hixon-Crowell 方程扩散系数;

n ——扩散释放指数。

1.3.8 体外释放试验 参照 Ramezanzade 等^[18]的方法, 按式(8)计算释放率。

$$R = \frac{R_t}{R_0} \times 100\%, \quad (8)$$

式中:

R ——释放率, %;

R_t ——每个取样时间点透析缓冲液中核桃多肽质量浓度, mg/mL;

R_0 ——样品溶液中核桃多肽质量浓度, mg/mL。

1.3.9 血管紧张素转化酶(ACE)抑制活性测定 参照王琛^[6]的方法, 按式(9)计算 ACE 抑制率。

$$A = \frac{M - N}{M} \times 100\%, \quad (9)$$

式中:

A ——ACE 抑制率, %;

M ——空白对照组中色谱峰面积;

N ——添加抑制剂组中色谱峰面积。

1.3.10 DPPH 自由基清除能力测定 参照 Arise 等^[22]的方法并修改。用磷酸盐缓冲液(0.2 mol/L, pH 7.0)配制质

量浓度为 2.0 mg/mL 的核桃多肽溶液。吸取 2.5 mL 核桃多肽溶液/样品上清液, 加入 1.0 mL 磷酸盐缓冲液和 2.0 mL DPPH 乙醇溶液(0.2 mmol/L), 混匀后, 室温避光静置 30 min, 测定 518 nm 处吸光值。用蒸馏水作为空白对照, 体积分数 95% 乙醇作为样品对照。按式(10)计算 DPPH 自由基清除率。

$$D = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100\%, \quad (10)$$

式中:

D ——DPPH 自由基清除率, %;

A_0 ——空白对照组吸光值;

A_1 ——试验组吸光值;

A_2 ——样品对照组吸光值。

1.3.11 还原力测定 参照 Oyaizu^[23]的方法并修改。用蒸馏水配制质量浓度为 2.0 mg/mL 的核桃多肽溶液。向试管中依次加入等体积(2.5 mL)的核桃多肽溶液/样品上清液、磷酸盐缓冲液(0.2 mol/L, pH 6.6)和质量分数为 1% 的铁氰化钾溶液, 混匀后, 50 °C 水浴 20 min。向混合物中加入 2.5 mL 质量分数为 10% 的三氯乙酸, 4 000 r/min 离心 10 min, 取 5.0 mL 上清液与 5.0 mL 蒸馏水和 1.0 mL 质量分数为 0.1% 的三氯化铁溶液混匀, 室温静置 20 min, 测定 700 nm 处吸光值。用蒸馏水作为空白对照。

1.4 数据处理

所有试验至少平行 3 次, 采用 Origin Pro 2019 和 SPSS Statistics 22.0 软件进行作图 and 数据分析。采用 Duncan 法检测显著性, $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 CS 质量分数对 CS-WP-L 理化性质的影响

由图 1 可知, 随着 CS 质量分数的增加, CS 聚积在脂质体表面, 包封率增大。当 CS 质量分数 $> 0.6\%$ 时, CS-WP-L 的包封率降低, 可能是过高的 CS 质量分数影响脂质体的 ζ -电位, 破坏脂质体膜结构, 使包封率下降^[24-25]。随着 CS 质量分数的增加, CS-WP-L 的 ζ -电位由负电位转

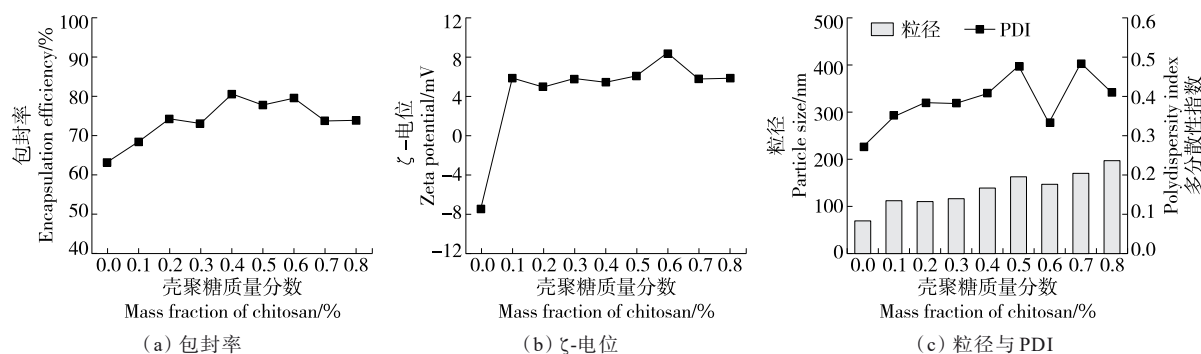


图 1 CS 质量分数对 CS-WP-L 理化性质的影响

Figure 1 Effects of CS mass fraction on physicochemical properties of CS-WP-L

向正电位,达到 8.39 mV。Chun 等^[26]研究表明,脂质体表面电荷刚好转变为正电荷时,聚合物浓度可被视为饱和浓度,此时脂质体表面已被聚合物完全覆盖。当 CS 质量分数为 0.6% 时,CS-WP-L 的粒径、PDI 值均降低。综上,当 CS 质量分数为 0.6% 时,包封率为 79.52%, ζ -电位为 8.39 mV,粒径为 147.04 nm,PDI 值为 0.33,此时 CS-WP-L 的粒径分布均匀,结构较为稳定。

2.2 SA 质量分数对 SA-CS-WP-L 理化性质的影响

由图 2 可知,随着 SA 质量分数的增加,包封率增加, ζ -电位由正电位转变为负电位,而脂质体囊泡直径以及

粒径有所增大,与 Liu 等^[19]的研究结果类似。当 SA 质量分数为 0.5% 时,包封率为 90.67%,粒径为 223.01 nm,PDI 值为 0.34, ζ -电位为 -17.10 mV,表明有大量的 SA 沉积在 CS-WP-L 表面^[27]。 ζ -电位高低可以用来反映脂质体的稳定性,其绝对值越大,说明脂质体有足够的斥力防止粒子聚集,有助于保持稳定性^[28]。Liu 等^[14]制备了中链脂肪酸纳米脂质体,以粒径与 ζ -电位为指标,确定了 SA 与 CS 的最佳添加量分别为 0.5%,0.6%。综上,当 SA 质量分数为 0.5% 时,SA-CS-WP-L 的粒径分布均匀,结构较为稳定。

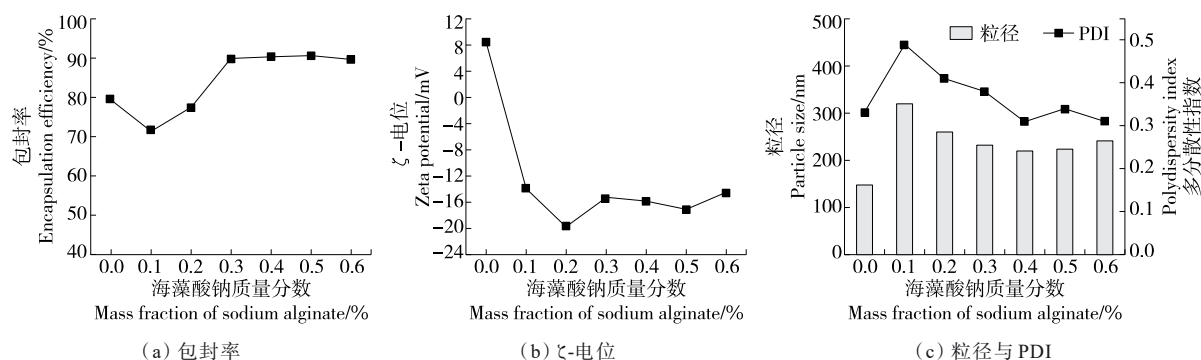


图 2 SA 质量分数对 SA-CS-WP-L 理化性质的影响

Figure 2 Effects of SA mass fraction on physicochemical properties of SA-CS-WP-L

2.3 脂质体表征

由表 1 可知,包埋核桃多肽后,WP-L 的粒径、PDI 值和 ζ -电位绝对值均得到提高。CS 修饰后,CS-WP-L 的包封率增加到 79.52%,可能是 CS 在磷脂表面形成保护层,减少了核桃多肽的释放^[17],也可能是游离核桃多肽被嵌入到 CS 中^[29]。此外,脂质体粒径增加到 147.04 nm,PDI 值增加到 0.33, ζ -电位增加到 8.39 mV。经 CS 修饰后,脂质体粒子间的静电斥力增大,抑制了粒子出现聚集与黏附现象,从而提高了体系的稳定性^[18]。

SA 修饰 CS-WP-L 后,脂质体的包封率增加至 90.67%,说明 SA-CS-WP-L 能够有效延缓核桃多肽的释放。脂质体粒径增加至 223.01 nm,是由于 SA 与 CS 通过静电相互作用在脂质体表面形成了致密的网络结构包被在脂质体外层^[14,19,30]。PDI 值可以代表溶液中分散物质的均匀性^[27]。经多糖修饰后,脂质体的 PDI 值虽有所增

大,但均 <0.5 ,可视为单分散系统^[13]。Jeon 等^[30]提出 PDI 值在 0.23~0.40 可以认为溶液的颗粒呈中等均匀分散,即粒径分布较窄,粒度分布较均匀。而 ζ -电位由 8.39 mV 转变为 -17.10 mV,说明 SA 成功聚积在 CS-WP-L 表面。

2.4 结构表征

2.4.1 透射电子显微镜 由图 3 可知,3 种脂质体样品均呈现球形囊泡结构,具有光滑的表面。WP-L 周围有黑色颗粒,说明核桃多肽被包裹在磷脂双层中^[31]。CS-WP-L 与 SA-CS-WP-L 存在核-壳结构,且 TEM 图的衬度发生改变,说明 CS 与 SA 成功沉积在脂质体表面^[32]。此外,脂质体囊泡大小不均,小囊泡有向大囊泡融合的趋势,可能与 Ostwald 自发熟化有关,该作用可以促进脂质体熟化,使其更加稳定^[33]。

2.4.2 傅里叶变换红外光谱 由图 4(a)可知,CS 的特征峰主要集中在 3447 cm^{-1} 处(由 O—H 键拉伸振动引起)

表 1 WP-L、CS-WP-L、SA-CS-WP-L 的包封率、粒径、PDI 和 ζ -电位[†]

Table 1 Encapsulation efficiency, particle size, PDI, and ζ -potential of WP-L, CS-WP-L, and SA-CS-WP-L

脂质体	包封率/%	粒径/nm	PDI	ζ -电位/mV
WP-L	63.10 $\pm$ 0.92 ^c	69.30 $\pm$ 0.49 ^c	0.27 $\pm$ 0.03 ^b	-7.50 $\pm$ 0.73 ^b
CS-WP-L	79.52 $\pm$ 1.15 ^b	147.04 $\pm$ 7.43 ^b	0.33 $\pm$ 0.02 ^a	8.39 $\pm$ 1.40 ^a
SA-CS-WP-L	90.67 $\pm$ 0.57 ^a	223.01 $\pm$ 2.97 ^a	0.34 $\pm$ 0.02 ^a	-17.10 $\pm$ 1.17 ^c

[†] 同列小写字母不同表示差异显著($P<0.05$)。

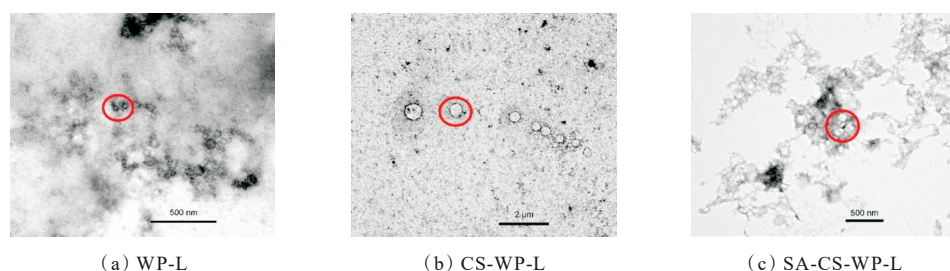


图 3 TEM 图像

Figure 3 TEM images

以及 $1\,632, 1\,596\text{ cm}^{-1}$ 处的酰胺 I 带和 II 带^[27,34]。CS-WP-L 位于 $2\,926\text{ cm}^{-1}$ 处的特征峰几乎没有变化,说明 CS-WP-L 的丙烯酸链的 CH_2 反对称拉伸振动的位置几乎不变^[14]。 $1\,424\text{ cm}^{-1}$ 处出现新特征峰,说明 WP-L 的磷酸基与 CS 之间存在静电吸引作用,WP-L 与 CS 形成的复合物使磷脂双层酰基链迁移受到限制,降低了膜的流动性^[18,31]。WP-L 在 $1\,131, 1\,050\text{ cm}^{-1}$ (由 PO_2^- 伸缩振动引起) 处的吸收峰红移至 $1\,129, 1\,047\text{ cm}^{-1}$, 是因为磷酸基团对 H 链敏感,表明 CS 与脂质体发生氢键作用^[14]。同样, $\text{C}=\text{O}$ 拉伸振动的吸收峰从 $1\,640\text{ cm}^{-1}$ 蓝移至 $1\,644\text{ cm}^{-1}$, 说明 CS 沉积在脂质体表面^[27]。

由图 4(b) 可知, SA 的特征峰主要集中在 $3\,447\text{ cm}^{-1}$ 处 (由 $\text{O}-\text{H}$ 键拉伸振动引起) 以及 $1\,612, 1\,417\text{ cm}^{-1}$ 处的羧基阴离子的不对称和对称拉伸振动^[34]。CS-WP-L 位于 $3\,386\text{ cm}^{-1}$ (由 $\text{O}-\text{H}$ 拉伸振动引起) 处的特征峰蓝移至 $3\,404\text{ cm}^{-1}$, 说明 SA 与 CS 发生疏水相互作用和氢键作用^[34]。SA-CS-WP-L 位于 $2\,926\text{ cm}^{-1}$ 处的吸收峰 (由丙烯酸链的 CH_2 不对称拉伸振动引起) 没有变化, 但由 $\text{C}=\text{O}$ 拉伸振动引起的吸收峰从 $1\,630\text{ cm}^{-1}$ 红移至 $1\,620\text{ cm}^{-1}$, 说明氢键作用力增加甚至形成新的氢键^[27]。CS 位于 $1\,632\text{ cm}^{-1}$ (酰胺 I 带) 处的特征峰消失, 说明氨基与酯基 ($-\text{COO}-$) 反应, SA 在 CS-WP-L 表面形成修饰层^[14]。

2.5 贮藏稳定性

由图 5 可知, 低温贮藏 19 d 后, WP-L、CS-WP-L 和 SA-CS-WP-L 的包封率分别由 54.34%, 77.15%, 86.26% 降低至 45.14%, 64.90%, 70.77%, 这是因为低温下脂质流动缓慢, 分子迁移率低且磷脂不易被氧化, 而 CS 与 SA 沉积在脂质体表面, 进一步降低了脂质体的流动性^[27]。与 4°C 相比, 25°C 下各样品的包封率下降幅度更大, 可能是室温下 CS 与 SA 发生吸附解离, 导致脂质体表面 ζ -电位值降低, 脂质体聚集沉降, 核桃多肽泄露。Karim 等^[31] 制备了果胶-壳聚糖新橙皮苷纳米脂质体, 26°C 贮藏 20 d 后, 新橙皮苷释放率上升。

随着 4°C 下贮藏时间的延长, 3 种样品的粒径和 PDI 值均显著提高 ($P < 0.05$), 而 ζ -电位整体上变化不明显。 25°C 贮藏 19 d 后, SA-CS-WP-L 的粒径激增到 826 nm, PDI 值增加到 0.76, ζ -电位绝对值降低至 18.1 mV。这主要是因为随着贮藏时间的延长, SA 与 CS 发生部分解吸, 静电斥力削弱, 在静电引力作用下形成架桥结构, 使脂质体互相吸引形成聚集^[35]。此外, Gibis 等^[36] 认为室温下微生物生长较快, 未添加抑菌物的脂质体溶液易受污染, 进而发生降解并导致其理化性能降低。

2.6 脂质体的胃肠消化稳定性

由图 6(a) 可知, 消化前 30 min, 3 种样品的释放速度

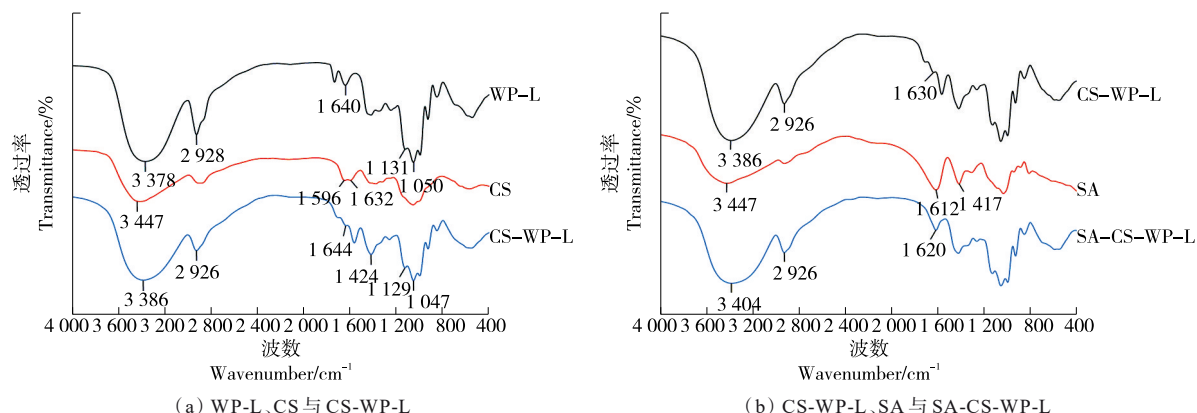


图 4 傅里叶红外光谱图

Figure 4 FTIR images

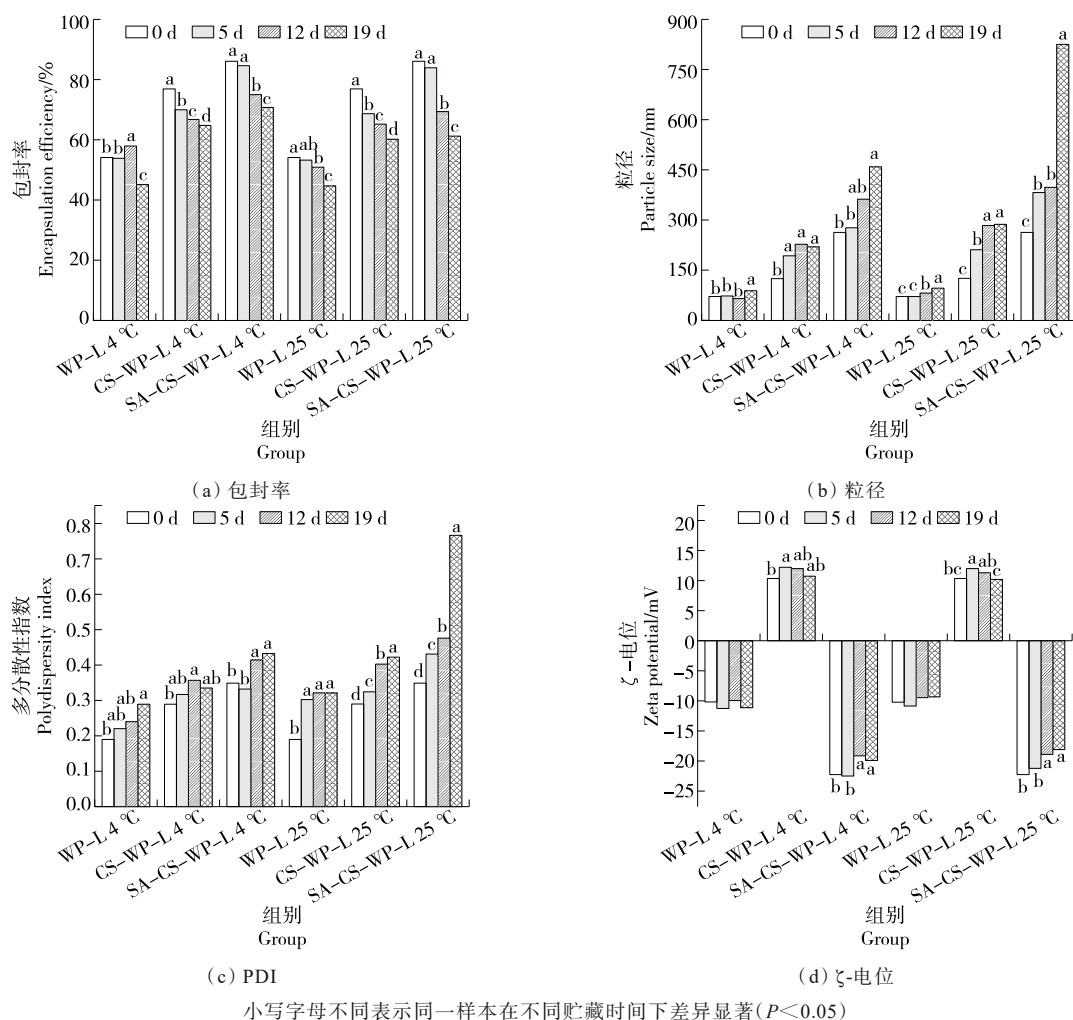


Figure 5 Physicochemical properties of samples before and after storage at different temperatures

快速增加;消化30~120 min,样品的释放率均缓慢增加。消化120 min后,WP-L、CS-WP-L与SA-CS-WP-L的核桃多肽释放率分别为55.55%,45.24%,32.38%。SA-CS-WP-L在SGF中的释放率最低,说明其缓释效果最好。WP-L表面带负电荷,在低pH下发生质子化,改变了磷脂双层结构,易造成核桃多肽泄露^[21]。Nam等^[37]指出,脂质体在胃酸环境与酶促条件的双重作用下易被降解。CS在抑制脂质体降解和核桃多肽释放方面发挥了重要作用。而SA与CS的结合进一步控制了释放速率,证明SA-CS-WP-L在缓释方面具有重要作用^[21]。此外,Liu等^[19]研究发现,海藻酸钠-壳聚糖脂质体在SGF和SIF消化2 h内维生素C的释放率均低于壳聚糖脂质体,并认为这是未溶解的SA在低pH下形成海藻酸表皮(SGF阶段)以及未溶解的CS在中性环境下凝结(SIF阶段)的结果。

SIF消化过程中的释放率变化趋势与SGF的相似,连续消化240 min后,WP-L、CS-WP-L与SA-CS-WP-L的核

桃多肽释放率分别为82.83%,72.11%,56.06%,表明脂质体样品在SIF中均可以延缓核桃多肽释放。Shishir等^[21]制备了果胶和CS偶联修饰的纳米脂质体用于包封新橙皮苷,在胃肠模拟消化中展现出良好的缓释效果。Song等^[38]制备了CS和豌豆分离蛋白水解物修饰的亚麻籽油脂质体,在模拟胃肠消化试验中,亚麻籽油的释放率显著降低。此外,相变温度、磷脂碳氢链长度、稳定剂(如胆固醇与胆盐)的存在与多糖修饰均会对脂质体的稳定性产生影响^[39]。

2.7 核桃多肽的释放机制

R^2 值代表了核桃多肽释放曲线与数学模型的拟合情况^[22,31]。由表2~表3可知,各样品在SGF或SIF中的一级动力学方程与Ritger-Peppas方程对应的 R^2 均高达0.99,大于零级方程、Higuchi方程与Hixon-Crowell方程的。值得注意的是,Ritger-Peppas方程的 R^2 略高于一级动力学方程,因此WP、WP-L、CS-WP-L与SA-CS-WP-L在SGF或SIF中的释放动力学模型均为Ritger-Peppas方程。扩散

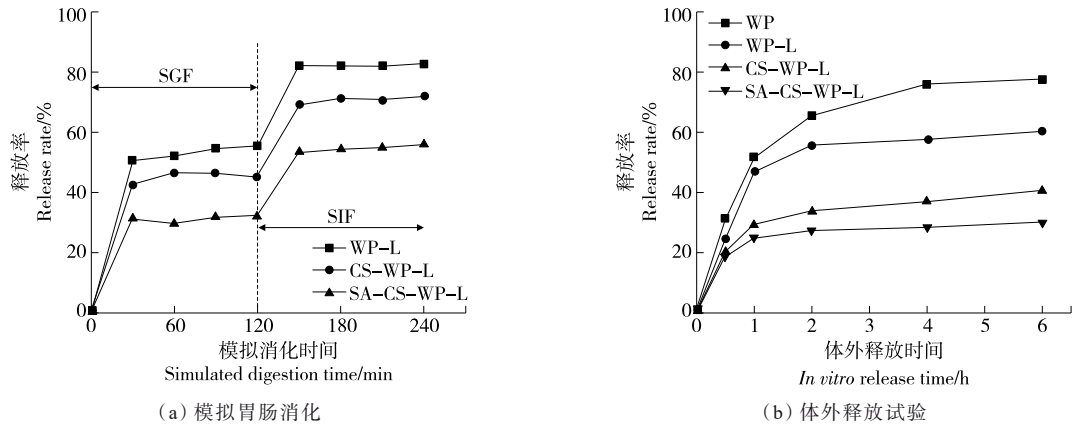


图 6 样品在模拟胃肠消化和体外释放试验中的多肽释放率

Figure 6 Polypeptide release rates of samples in simulated gastrointestinal digestion and *in vitro* release experiment

系数 k_i 为释放速率常数, WP 的释放速率均 >90 , 说明多肽在模拟消化中被消化酶快速降解。WP-L、CS-WP-L 与 SA-CS-WP-L 在 SGF 中的释放速率为 41.40, 34.67, 25.91, 在 SIF 中的释放速率为 55.72, 32.62, 25.59, 说明各样品特别是 SA-CS-WP-L 可以有效减缓核桃多肽泄露。扩散指数 $n \leq 0.45$ 为 Fick 扩散, $n \geq 0.89$ 为骨架溶蚀, $0.45 < n < 0.89$ 为 Non-Fick 扩散 (即药物扩散与骨架溶蚀共同作用)^[40]。WP、WP-L、CS-WP-L 与 SA-CS-WP-L 在 SGF 或

SIF 中的 n 值均 < 0.45 , 说明样品的释放行为属于 Fick 扩散。

2.8 脂质体的体外释放

由图 6(b) 可知, 体外释放前 1 h, 4 种样品的释放率均快速增加, 分别为 51.91%, 46.93%, 29.44%, 25.02%, 约占总释放率的 50%。体外释放 6 h 后, WP 和 WP-L 的核桃多肽释放率分别为 77.63% 和 60.41%, 表明脂质体对核桃多肽产生了保护作用 and 缓释效果。龚魁杰^[33]研究发现, 当

表 2 WP、WP-L、CS-WP-L 与 SA-CS-WP-L 在模拟胃液中的释放动力学方程拟合结果

样品	拟合方程	拟合表达式	R^2
WP	零级方程	$M_t/M_\infty = 0.468\ 9t + 54.316\ 8$	0.142\ 8
	一级方程	$M_t/M_\infty = (1 - e^{-0.345\ 1t}) \times 94.826\ 4$	0.999\ 8
	Ritger-Peppas 方程	$M_t/M_\infty = 93.413\ 8t^{0.003\ 6}$	0.999\ 9
	Higuchi 方程	$M_t/M_\infty = 7.430\ 0t^{1/2} + 32.448\ 2$	0.489\ 7
	Hixon-Crowell 方程	$M_t/M_\infty = 0.000\ 4t^3 - 0.084t^2 + 5.262\ 3t + 10.270\ 0$	0.674\ 0
WP-L	零级方程	$M_t/M_\infty = 0.300\ 6t + 27.936\ 7$	0.269\ 7
	一级方程	$M_t/M_\infty = (1 - e^{-0.161\ 1t}) \times 53.499\ 5$	0.992\ 6
	Ritger-Peppas 方程	$M_t/M_\infty = 41.396\ 1t^{0.060\ 5}$	0.999\ 3
	Higuchi 方程	$M_t/M_\infty = 4.480\ 0t^{1/2} + 15.690\ 7$	0.615\ 7
	Hixon-Crowell 方程	$M_t/M_\infty = 0.000\ 2t^3 - 0.043\ 0t^2 + 2.762\ 0t + 5.263\ 2$	0.724\ 0
CS-WP-L	零级方程	$M_t/M_\infty = 0.249\ 2t + 23.790\ 8$	0.250\ 0
	一级方程	$M_t/M_\infty = (1 - e^{-0.139\ 7t}) \times 45.502\ 5$	0.995\ 2
	Ritger-Peppas 方程	$M_t/M_\infty = 34.670\ 1t^{0.062\ 3}$	0.995\ 5
	Higuchi 方程	$M_t/M_\infty = 3.767\ 1t^{1/2} + 13.306\ 4$	0.607\ 0
	Hixon-Crowell 方程	$M_t/M_\infty = 0.000\ 1t^3 - 0.035\ 3t^2 + 2.334\ 2t + 3.935\ 4$	0.783\ 8
SA-CS-WP-L	零级方程	$M_t/M_\infty = 0.169\ 9t + 16.771\ 0$	0.231\ 9
	一级方程	$M_t/M_\infty = (1 - e^{-0.167\ 0t}) \times 31.359\ 6$	0.994\ 6
	Ritger-Peppas 方程	$M_t/M_\infty = 25.913\ 3t^{0.044\ 4}$	0.995\ 5
	Higuchi 方程	$M_t/M_\infty = 2.571\ 6t^{1/2} + 9.602$	0.578\ 1
	Hixon-Crowell 方程	$M_t/M_\infty = 0.000\ 1t^3 - 0.026\ 8t^2 + 1.683\ 6t + 3.020\ 5$	0.728\ 4

表3 WP、WP-L、CS-WP-L与SA-CS-WP-L在模拟肠液中的释放动力学方程拟合结果

Table 3 Fitting results of release kinetics equation of WP, WP-L, CS-WP-L, and SA-CS-WP-L in simulated intestinal fluid

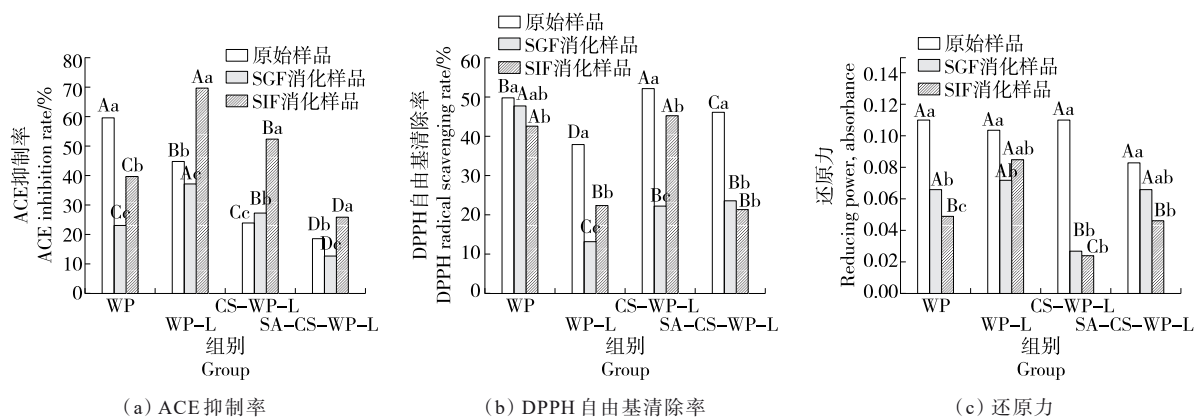
样品	拟合方程	拟合表达式	R^2
WP	零级方程	$M_t/M_\infty=0.457\ 9t+54.027\ 8$	0.132\ 9
	一级方程	$M_t/M_\infty=(1-e^{-0.390\ 6t})\times 93.734\ 9$	0.999\ 5
	Ritger-Peppas 方程	$M_t/M_\infty=93.763\ 5t^{0.000\ 2}$	0.999\ 6
	Higuchi 方程	$M_t/M_\infty=7.300\ 7t^{1/2}+32.392\ 7$	0.479\ 9
	Hixon-Crowell 方程	$M_t/M_\infty=0.000\ 4t^3-0.082\ 87t^2+5.204\ 2t+10.254\ 9$	0.667\ 7
WP-L	零级方程	$M_t/M_\infty=0.308\ 1t+33.664\ 4$	0.174\ 6
	一级方程	$M_t/M_\infty=(1-e^{-0.224\ 3t})\times 60.235\ 8$	0.999\ 1
	Ritger-Peppas 方程	$M_t/M_\infty=55.718\ 8t^{0.018\ 1}$	0.999\ 2
	Higuchi 方程	$M_t/M_\infty=4.797\ 3t^{1/2}+19.824\ 6$	0.522\ 3
	Hixon-Crowell 方程	$M_t/M_\infty=0.000\ 3t^3-0.054\ 15t^2+3.363\ 4t+5.949\ 5$	0.726\ 0
CS-WP-L	零级方程	$M_t/M_\infty=0.272\ 8t+23.699\ 7$	0.308\ 0
	一级方程	$M_t/M_\infty=(1-e^{-0.122\ 0t})\times 47.384\ 2$	0.994\ 7
	Ritger-Peppas 方程	$M_t/M_\infty=32.624\ 74t^{0.085\ 5}$	0.997\ 2
	Higuchi 方程	$M_t/M_\infty=4.016\ 9t^{1/2}+12.888\ 5$	0.657\ 7
	Hixon-Crowell 方程	$M_t/M_\infty=0.000\ 2t^3-0.037\ 7t^2+2.441\ 7t+3.588\ 4$	0.832\ 6
SA-CS-P-L	零级方程	$M_t/M_\infty=0.187\ 9t+17.296\ 1$	0.275\ 5
	一级方程	$M_t/M_\infty=(1-e^{-0.161\ 6t})\times 33.229\ 7$	0.991\ 4
	Ritger-Peppas 方程	$M_t/M_\infty=25.594\ 3t^{0.061\ 71}$	0.998\ 8
	Higuchi 方程	$M_t/M_\infty=2.789\ 9t^{1/2}+9.704\ 8$	0.619\ 2
	Hixon-Crowell 方程	$M_t/M_\infty=0.000\ 1t^3-0.027\ 4t^2+1.741\ 8t+3.167\ 6$	0.741\ 6

反应时间为 16 h 时,花生短肽纳米脂质体的游离肽释放率降至 10% 左右,有效延缓了肽的释放,这是因为纳米脂质体结构致密,能够阻止亲水性或疏水性核桃多肽迁移到其他介质。相比之下,CS-WP-L 与 SA-CS-WP-L 的释放率进一步降低,表明经过多糖修饰的脂质体具有比 WP-L 更优异的缓释效果,其原因是 SA-CS-WP-L 通过 CS

与 SA 涂层在脂质体表面形成保护层,延缓了脂质体膜的流动性,同时延长了核桃多肽泄露所需时间^[18]。

2.9 ACE 抑制活性与抗氧化活性

由图 7(a)可知,ACE 抑制率从大到小分别为 59.5% (WP)、44.7% (WP-L)、23.9% (CS-WP-L) 和 8.6% (SA-CS-WP-L)。经脂质体包埋与多糖修饰后,核桃多肽的 ACE



大写字母不同表示不同样本在相同处理下差异显著 ($P<0.05$); 小写字母不同表示同一样本在不同处理下差异显著 ($P<0.05$)

图7 WP、WP-L、CS-WP-L 和 SA-CS-WP-L 的 ACE 抑制率、DPPH 自由基清除率和还原力

Figure 7 ACE inhibition rate, DPPH free radical scavenging rate, and reducing power of WP, WP-L, CS-WP-L, and SA-CS-WP-L

抑制率发生不同程度的降低,表明核桃多肽被脂质体成功包埋^[41]。脂质体的外层囊膜作为物理屏障,减少了被荷载多肽与 ACE 的接触机会。而通过 CS 和 SA 的表面修饰,囊泡的结构刚性得到提升,进一步延缓了负载肽的释放进程。这种双重作用导致肽类物质与 ACE 的相互作用效率有所下降^[42-43]。该现象表明,纳米脂质体系统通过抑制肽类成分的泄漏,能够有效维持其对 ACE 的长期抑制效能。

经 SGF 消化后,ACE 抑制率较初始样品均发生明显变化($P<0.05$)。核桃多肽的 ACE 抑制率下降幅度最大,其次是 WP-L 和 SA-CS-WP-L。而经 SIF 消化后,ACE 抑制活性较 SGF 相比发生反弹,WP-L、CS-WP-L 与 SA-CS-WP-L 的分别增至 69.60%,52.35%,26.92%,可能是因为长链核桃多肽在 SIF 中被分解为短链核桃多肽,随着小肽和氨基酸含量的增加,多肽总量增加^[44]。CS-WP-L 的抑制活性增加较快,可能是 CS 对 pH 敏感,在肠道环境下(pH 7.4)CS 容易被降解,而未降解的 CS 互相黏附,破坏了脂质体的稳定性^[19]。

由图 7(b)可知,核桃多肽的 DPPH 自由基清除率为 49.74%,WP-L 的降至 38.03%,说明脂质体包埋与多糖修饰能够防止核桃多肽与 DPPH 试剂相互作用。而 CS-WP-L 与 SA-CS-WP-L 的 DPPH 自由基清除率发生不同程度的增加,可能是 SA 和 CS 与磷脂之间产生了协同或累加效应。经 SGF 消化后,样品的 DPPH 自由基清除率均产生不同程度的下降。经 SIF 消化后,由于 CS 易在肠道内发生降解,且 CS 之间产生架桥使 CS-WP-L 之间聚集沉降,导致脂质体稳定性被破坏,使得 CS-WP-L 有较高的 DPPH 自由基清除率^[21]。而 WP-L 与 SA-CS-WP-L 则因本身带负电荷,与 SIF 之间产生静电斥力提高了脂质体稳定性,减少了核桃多肽泄露,因此呈相反的变化趋势。

由图 7(c)可知,消化前各样品的还原力无明显差异。Mazloomi 等^[25]发现脂质体的还原力与活性物质的类型、氨基酸组成、水解时间以及所用酶类型有关。模拟胃肠消化后,核桃多肽与脂质体样品的还原力均发生不同程度的下降。核桃多肽被消化酶消化分解,反应物数量减少导致还原力下降。经 SGF 消化后,CS-WP-L 的还原力最小,可能是 SGF 中含有的大量氢离子与 CS-WP-L 产生静电排斥作用,有效防止了脂质体聚集,从而抑制了核桃多肽的释放。经 SIF 消化后,CS-WP-L 与 SA-CS-WP-L 的吸光值均低于 WP-L 的,说明聚合物共轭载体的稳定性比非共轭载体的更好^[21]。此外,由于消化酶必须先穿过多糖网络结构才能发挥作用^[45],而 SA 与 CS 的引入恰好推迟了消化酶抵达脂质体表面的时间,因而延缓了核桃多肽的释放。

3 结论

采用海藻酸钠和壳聚糖对核桃多肽脂质体进行了双层表面修饰。结果表明,在海藻酸钠和壳聚糖质量分数分别为 0.5%、0.6% 的条件下,脂质体对核桃多肽的包封率为 90.67%、 ζ -电位为 -17.10 mV。通过透射电镜观测可知,海藻酸钠-壳聚糖核桃多肽脂质体为球形囊泡状结构,表面光滑。红外光谱结果显示,海藻酸钠与壳聚糖通过疏水相互作用和氢键作用沉积在脂质体表面,有效形成了保护层。在 19 d 的低温贮藏试验中,海藻酸钠-壳聚糖核桃多肽脂质体展现出优异的包封率稳定性和理化特性。模拟胃肠消化试验和体外释放结果表明,海藻酸钠-壳聚糖核桃多肽脂质体能显著延缓核桃多肽的释放,同时维持其在消化过程中的长效血管紧张素转化酶抑制效能和良好的抗氧化活性。在模拟释放机制研究中,核桃多肽还展示出典型的 Fick 扩散行为。然而,该研究尚未在细胞层面评估海藻酸钠-壳聚糖核桃多肽脂质体的毒性与摄取机理,也未通过动物试验探究其体内消化性能。未来可利用 Caco-2 等细胞模型系统研究其细胞毒性及摄取转运机制,同时采用小鼠模型进行体内消化及缓释试验,以进一步评估其生物利用度。

参考文献

- [1] 王宸轩, 吴丹, 张素榕, 等. 核桃粕固态发酵酱油的制备及抗氧化性分析[J]. 食品与机械, 2023, 39(5): 182-185, 202.
- [2] WANG C X, WU D, ZHANG S R, et al. Preparation of solid fermented soy sauce in walnut dregs and analysis of antioxidant properties[J]. Food & Machinery, 2023, 39(5): 182-185, 202.
- [3] YANG L K, ZHU W Z, DING Y Y, et al. New insights into altering the structures and improving the functional properties of walnut protein: synergistic high-pressure homogenization/limited enzymatic hydrolysis[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2025, 102: 104018.
- [4] WANG Y X, TAN B, CHEN C, et al. The phenolic profile of walnut meal protein isolate and interaction of phenolics with walnut protein[J]. Food Research International, 2023, 170: 113042.
- [5] 韦雅虹. 酶解法制备核桃肽及其相关产品开发[D]. 阿拉尔: 塔里木大学, 2024: 11-12.
- [6] WEI Y H. Enzymatic preparation of walnut peptide and related product development[D]. Ala'er: Tarim University, 2024: 11-12.
- [7] 倪策, 曹天红, 陈敏, 等. 核桃粕源抗氧化活性肽的酶解制备及活性分析[J]. 食品与机械, 2024, 40(5): 51-61.
- [8] NI C, CAO T H, CHEN M, et al. Enzymatic hydrolysis preparation and activity analysis of antioxidant peptides derived from walnut dregs[J]. Food & Machinery, 2024, 40(5): 51-61.
- [9] 王琛. 核桃蛋白源 ACE 抑制肽的分离纯化与鉴定[D]. 北京: 北京林业大学, 2020: 11-33.

- WANG C. Isolation, purification and identification of ACE inhibitory peptide from walnut protein[D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2020: 11-33.
- [7] WANG M, SUN X Y, LUO W, et al. Characterization and analysis of antioxidant activity of walnut-derived pentapeptide PW5 via nuclear magnetic resonance spectroscopy[J]. Food Chemistry, 2021, 339: 128047.
- [8] QIN W, KETNAWA S, OGAWA Y. Effect of digestive enzymes and pH on variation of bioavailability of green tea during simulated *in vitro* gastrointestinal digestion[J]. Food Science and Human Wellness, 2022, 11(3): 669-675.
- [9] 尤婷婷, 马永强, 赵若冰, 等. 叶黄素纳米脂质体的制备及体外消化特性研究[J]. 食品与机械, 2025, 41(12): 28-36.
- YOU T T, MA Y Q, ZHAO R B, et al. Preparation and *in vitro* digestion characteristics of lutein nanoliposomes[J]. Food & Machinery, 2025, 41(12): 28-36.
- [10] LUO Y X, WANG F L, YUAN X Y, et al. Walnut peptide loaded proliposomes with hydroxyapatite as a carrier: fabrication, environmental stability, and *in vitro* digestion attribute[J]. Food Research International, 2022, 162(Pt B): 112057.
- [11] CAO S N, HAO J, WANG Y Z, et al. Chitosan-coated nanoliposomes for the enhanced stability of walnut angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide[J]. Journal of Food Science, 2023, 88(5): 2 130-2 140.
- [12] WANG X Y, CAO Z X, SU J Y, et al. Preparation of sodium alginate and chitosan modified curcumin liposomes and study on the formation of protein corona[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2025, 293: 139392.
- [13] TAN X Y, LIU Y, WU X X, et al. Layer-by-layer self-assembled liposomes prepared using sodium alginate and chitosan: insights into vesicle characteristics and physicochemical stability[J]. Food Hydrocolloids, 2024, 149: 109606.
- [14] LIU W L, LIU J H, LIU W, et al. Improved physical and *in vitro* digestion stability of a polyelectrolyte delivery system based on layer-by-layer self-assembly alginate - chitosan-coated nanoliposomes[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(17): 4 133-4 144.
- [15] 贺建华, 鹿麟, 邵纯君, 等. 福林酚法与考马斯亮蓝法测定甘露聚糖肽口服溶液中蛋白质含量的比较[J]. 中国药师, 2017, 20(10): 1 861-1 863.
- HE J H, LU L, SHAO C J, et al. Comparison of protein content determination respectively by folin-ciocalteu method and coomassie brilliant blue binding method for mannate oral solution[J]. China Pharmacist, 2017, 20(10): 1 861-1 863.
- [16] 方顺翔. 核桃多肽纳米脂质体制备、结构及稳定性研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2020: 31.
- FANG S X. Production of nanoliposomes loaded with walnut protein hydrolysates: structure and stability[D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2020: 31.
- [17] SARABANDI K, JAFARI S M. Effect of chitosan coating on the properties of nanoliposomes loaded with flaxseed-peptide fractions: stability during spray-drying[J]. Food Chemistry, 2020, 310: 125951.
- [18] RAMEZANZADE L, HOSSEINI S F, NIKKHAH M. Biopolymer-coated nanoliposomes as carriers of rainbow trout skin-derived antioxidant peptides[J]. Food Chemistry, 2017, 234: 220-229.
- [19] LIU W L, LIU W, YE A Q, et al. Environmental stress stability of microencapsules based on liposomes decorated with chitosan and sodium alginate[J]. Food Chemistry, 2016, 196: 396-404.
- [20] BRODKORB A, EGGER L, ALMINGER M, et al. INFOGEST static *in vitro* simulation of gastrointestinal food digestion[J]. Nature Protocols, 2019, 14(4): 991-1 014.
- [21] SHISHIR M R I, KARIM N, GOWD V, et al. Pectin-chitosan conjugated nanoliposome as a promising delivery system for neohesperidin: characterization, release behavior, cellular uptake, and antioxidant property[J]. Food Hydrocolloids, 2019, 95: 432-444.
- [22] ARISE A K, ALASHI A M, NWACHUKWU I D, et al. Antioxidant activities of Bambara groundnut (*Vigna subterranea*) protein hydrolysates and their membrane ultrafiltration fractions[J]. Food & Function, 2016, 7(5): 2 431-2 437.
- [23] OYAIU M. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine[J]. Japanese Journal of Nutrition, 1986, 44: 307-315.
- [24] LI Z Y, PAULSON A T, GILL T A. Encapsulation of bioactive salmon protein hydrolysates with chitosan-coated liposomes [J]. Journal of Functional Foods, 2015, 19: 733-743.
- [25] MAZLOOMI S N, MAHOONAK A S, GHORBANI M, et al. Physicochemical properties of chitosan-coated nanoliposome loaded with orange seed protein hydrolysate[J]. Journal of Food Engineering, 2020, 280: 109976.
- [26] CHUN J Y, CHOI M J, MIN S G, et al. Formation and stability of multiple-layered liposomes by layer-by-layer electrostatic deposition of biopolymers[J]. Food Hydrocolloids, 2013, 30 (1): 249-257.
- [27] SHISHIR M R I, KARIM N, XU Y, et al. Improving the physicochemical stability and functionality of nanoliposome using green polymer for the delivery of pelargonidin-3-O-glucoside[J]. Food Chemistry, 2021, 337: 127654.
- [28] CHAY S Y, TAN W K, SAARI N. Preparation and characterisation of nanoliposomes containing winged bean seeds bioactive peptides[J]. Journal of Microencapsulation, 2015, 32(5): 488-495.
- [29] ZHOU F, XU T, ZHAO Y J, et al. Chitosan-coated liposomes as delivery systems for improving the stability and oral bioavailability of acteoside[J]. Food Hydrocolloids, 2018, 83:

- 17-24.
- [30] JEON S, YOO C Y, PARK S N. Improved stability and skin permeability of sodium hyaluronate-chitosan multilayered liposomes by Layer-by-Layer electrostatic deposition for quercetin delivery[J]. Colloids and Surfaces B, Biointerfaces, 2015, 129: 7-14.
- [31] KARIM N, SHISHIR M R I, CHEN W. Surface decoration of neohesperidin-loaded nanoliposome using chitosan and pectin for improving stability and controlled release[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 164: 2 903-2 914.
- [32] 刘欣. 维生素 C/ β -胡萝卜素复合脂质体的制备及性质研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2020: 61.
- LIU X. Preparation and properties of vitamin C/ β -carotene co-encapsulation liposomes[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2020: 61.
- [33] 龚魁杰. 花生纳米肽制备与吸收转运机制研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2016: 75-87.
- GONG K J. Study on preparation of peanut nano-peptide and *in vitro* absorbiton and transport mechanism[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2016: 75-87.
- [34] KHAN M A, YUE C, FANG Z, et al. Alginate/chitosan-coated zein nanoparticles for the delivery of resveratrol[J]. Journal of Food Engineering, 2019, 258: 45-53.
- [35] LIU W L, TIAN M M, KONG Y Y, et al. Multilayered vitamin C nanoliposomes by self-assembly of alginate and chitosan: long-term stability and feasibility application in mandarin juice [J]. LWT-Food Science and Technology, 2017, 75: 608-615.
- [36] GIBIS M, THELLMANN K, THONGKAEW C, et al. Interaction of polyphenols and multilayered liposomal-encapsulated grape seed extract with native and heat-treated proteins[J]. Food Hydrocolloids, 2014, 41: 119-131.
- [37] NAM J, VANDERLICK T K, BEALES P A. Formation and dissolution of phospholipid domains with varying textures in hybrid lipo-polymersomes[J]. Soft Matter, 2012, 8(30): 7 982-7 988.
- [38] SONG F F, CHEN J, ZHANG Z Q, et al. Preparation, characterization, and evaluation of flaxseed oil liposomes coated with chitosan and pea protein isolate hydrolysates[J]. Food Chemistry, 2023, 404(Pt A): 134547.
- [39] NIU Z G, CONEJOS-SÁNCHEZ I, GRIFFIN B T, et al. Lipid-based nanocarriers for oral peptide delivery[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2016, 106: 337-354.
- [40] ANSARIFAR E, MOHEBBI M, SHAHIDI F, et al. Novel multilayer microcapsules based on soy protein isolate fibrils and high methoxyl pectin: production, characterization and release modeling[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 97: 761-769.
- [41] LATORRES J M, AQUINO S, ROCHA M, et al. Nanoencapsulation of white shrimp peptides in liposomes: characterization, stability, and influence on bioactive properties [J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2021, 45(7): e15591.
- [42] LI Y, ZHANG Y C, CHAI Z, et al. Entrapment of an ACE inhibitory peptide into ferritin nanoparticles coated with sodium deoxycholate: improved chemical stability and intestinal absorption[J]. LWT-Food Science and Technology, 2021, 147: 111547.
- [43] RAMEZANZADE L, HOSSEINI S F, AKBARI-ADERGANI B, et al. Cross-linked chitosan-coated liposomes for encapsulation of fish-derived peptide[J]. LWT-Food Science and Technology, 2021, 150: 112057.
- [44] 杨雪. 基于胃肠消化的大分子大米降血压肽酶法制备及其过程原位实时监测[D]. 镇江: 江苏大学, 2018: 63.
- YANG X. The preparation of macromolecular rice hypotensive peptide basing on gastrointestinal digestion and in situ real-time monitoring of its enzymatic process[D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2018: 63.
- [45] MCCLEMENTS D J. Food hydrocolloids: application as functional ingredients to control lipid digestion and bioavailability[J]. Food Hydrocolloids, 2021, 111: 106404.