

超临界二氧化碳制备虾青素脂质体

刘志军, 刘 谦, 王荣濠, 李志义, 刘凤霞, 魏 炜*

(大连理工大学 流体与粉体工程研究设计所, 辽宁 大连 116024)

摘要: 以大豆卵磷脂为载体, 利用超临界二氧化碳制备了虾青素脂质体。采用 FTIR、TEM、XRD 对样品进行了表征。利用纳米粒度及 Zeta 电位分析仪、紫外-可见分光光度计, 考察了制备压力和温度对虾青素脂质体粒径分布、Zeta 电位及虾青素包埋率的影响。通过体外模拟释放和模拟消化实验评价了虾青素脂质体的虾青素缓释效果。结果表明, 在超临界二氧化碳压力 20 MPa、50 °C 的最佳条件下, 制备的虾青素脂质体平均粒径为 236.0 nm, 虾青素包埋率 97.18%。经 30 d 储存后, 4 和 25 °C 的虾青素脂质体的虾青素保留率分别为 94.13% 和 89.04%; 体外释放实验表明, 虾青素脂质体具有较好的虾青素缓释效果, 在 4、12 h 的总释放率分别为 69.3% 和 91.0%; 体外消化模拟表明, 虾青素脂质体在肠道中消化和吸收较强。

关键词: 超临界二氧化碳; 虾青素; 脂质体; 粒径; 包埋率; 医药原料

中图分类号: TQ469 文献标识码: A 文章编号: 1003-5214 (2025) 04-0872-06

Preparation of astaxanthin liposomes using supercritical carbon dioxide

LIU Zhijun, LIU Qian, WANG Ronghao, LI Zhiyi, LIU Fengxia, WEI Wei*

(R&D Institute of Fluid and Powder Engineering, Dalian University of Technology, Dalian 116024, Liaoning, China)

Abstract: Astaxanthin liposomes were prepared using supercritical carbon dioxide with soya lecithin as lipid carrier, and characterized by FTIR, TEM and XRD. The effects of preparation pressure and temperature on particle size distribution, Zeta potential and astaxanthin encapsulation rate of astaxanthin liposomes were analyzed via nanometer particle size and Zeta potential analyzer as well as UV-visible spectrophotometer. The sustained release performance of astaxanthin liposomes was evaluated through *in vitro* simulated release and simulated digestion experiments. The results demonstrated that under the optimal conditions of supercritical carbon dioxide pressure of 20 MPa and 50 °C, the prepared astaxanthin liposomes showed an average particle size of 236.0 nm, and an astaxanthin encapsulation rate of 97.18%. After 30 d storage, the astaxanthin retention rate of astaxanthin liposomes at 4 and 25 °C was 94.13% and 89.04%, respectively. *In vitro* release experiments demonstrated that the astaxanthin liposomes exhibited excellent slow-release effect, with total release rates of 69.3% and 91.0% at 4 and 12 h, respectively. *In vitro* digestion simulations indicated that the astaxanthin liposomes exhibited enhanced digestion and absorption in the intestine.

Key words: supercritical carbon dioxide; astaxanthin; liposomes; particle size; encapsulation efficiency; drug materials

虾青素是一种类胡萝卜素, 具有较高的营养和药用价值^[1]。研究表明, 每天摄入 4 mg 虾青素有益于人体健康。虾青素具有抗癌、抗感染、抗氧化活性, 可以有效抑制和降低自由基引发的脂质过氧化, 还能显著影响动物的免疫功能和新陈代谢, 明显增

强人体肌肉力量和耐受力^[2]。但虾青素为脂溶性化合物, 存在稳定性差、易氧化、不宜服用等缺点, 降低了其生物利用度^[3-4]。因此, 对虾青素进行包覆来提高其稳定性和生物利用度, 制备易服用产品, 成为近年来的研究热点。

脂质体是一种封装介质, 在稳定和输送营养保健品方面具有很多应用^[5-7], 可以封装姜黄素^[8]、白藜芦醇^[9]、槲皮素^[10]、叶黄素^[11]等。从微观结构上看, 脂质体是一种由磷脂双分子层和水性核心层组成的自组装囊泡, 能对外界不利条件形成物理屏障, 提高封装物质的生物利用度。脂质体的典型制备方法包括薄膜水合法^[12]、乙醇注入法^[13]、反相蒸发法^[14]、复乳法^[15]等。但这些方法通常会导致脂质体出现有机溶剂/表面活性剂残留、大小分布不均匀和储存稳定性低等问题。为了解决这些问题, 研究者探索出利用超临界流体制备脂质体的方法^[16-19]。目前, 超临界二氧化碳工艺已成功制备出负载叶黄素脂质体^[11]、白术内酯脂质体^[20]、姜黄素脂质体^[21]、紫杉醇脂质体^[22]等。此工艺制备的脂质体不含有机溶剂, 具有粒径小、囊泡完整性强、储存稳定性高等特点。

本文拟利用超临界二氧化碳将虾青素封装在脂质体中, 利用 TEM、XRD、FTIR 等表征超临界二氧化碳将虾青素包覆在脂质体中的有效性, 考察不同制备压力、制备温度对虾青素脂质体的粒径分布、包埋率等性质的影响, 并对制备的虾青素脂质体进行形态观察、体外模拟释放和模拟消化实验。以期超临界二氧化碳制备脂质体的进一步研究提供相关数据支持。

1 实验部分

1.1 材料、试剂与仪器

虾青素油树脂(虾青素质量分数 10%), 大连医诺生物股份有限公司; 大豆卵磷脂, 上海麦克林生化科技股份有限公司; 人工胃液、人工肠液, 上海源叶生物科技有限公司; 石油醚、磷钨酸, 分析纯, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 无水乙醇, 分析纯, 天津市富宇精细化工有限公司; 二氧化碳, 体积分数 99%, 大连浚枫气体有限公司; 去离子水, 自制。

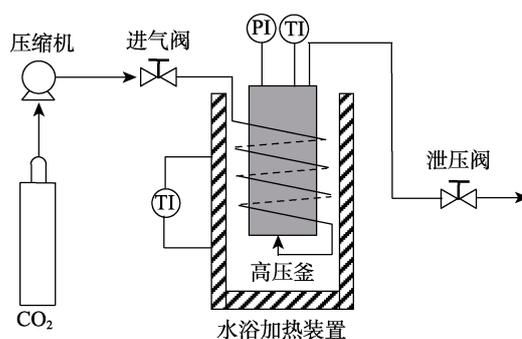
UV-1800SPC 型双光束紫外-可见分光光度计(UV-Vis), 上海美析仪器有限公司; Zetasizer Nano ZS90 型纳米粒度及 Zeta 电位分析仪, 英国马尔文仪器有限公司; LGJ-12 型冷冻干燥机, 北京松源华兴科技发展有限公司; Nicolet 6700 型傅里叶变换红外光谱仪(FTIR), 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; SmartLab 型 X 射线衍射仪(XRD), 日本 Rigaku 公司; JEM-F200 型透射电子显微镜(TEM), 日本电子株式会社; HY-4B 型调速振荡器, 上海力辰邦西仪器科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 虾青素脂质体的制备

将 1.0 g 大豆卵磷脂加入到 100 mL 去离子水

中, 使用磁力搅拌器以 1000 r/min 的转速持续搅拌 30 min, 使大豆卵磷脂均匀分散在水中; 然后, 向其中加入 0.1 g 虾青素油树脂, 黑暗中继续搅拌 1 h 混合均匀, 得到虾青素脂质体的预备液; 将预备液置于图 1 所示的超临界高压釜中, 将高压釜加热至设定温度, 用二氧化碳加压至设定压力后保压 1 h; 最后, 降温、泄压, 即得虾青素脂质体产品。



PI 为压力传感器; TI 为温度传感器

图 1 设备示意图

Fig. 1 Schematic diagram of equipment

1.2.2 虾青素标准曲线的绘制

将虾青素油树脂以石油醚为溶剂配制不同质量浓度(10、20、30、40、50、60 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的虾青素石油醚溶液, 使用 UV-Vis 测定各质量浓度虾青素石油醚溶液在 464 nm 波长处的吸光度, 以虾青素石油醚溶液质量浓度为横坐标, 以吸光度为纵坐标, 绘制标准曲线, 并拟合得到标准曲线方程为 $y=0.0251x+0.0673$, $R^2=0.99958$ 。

1.3 表征方法与性能测试

1.3.1 粒径和 Zeta 电位测定

使用纳米粒度及 Zeta 电位分析仪测定, 平衡时间 2 min。将脂质体稀释至透光后加入到样品池中进行测量^[23]。

1.3.2 包埋率测定

将 0.5 mL 虾青素脂质体与 3 mL 石油醚混合, 在振荡器中均匀振荡 2 min 后, 以 3000 r/min 的转速离心 10 min, 分离上清液放在石英比色皿中, 利用 UV-Vis 测定 464 nm 波长处的吸光度, 根据标准曲线方程计算游离虾青素的质量浓度。根据式(1)计算脂质体包埋率(%)^[24]:

$$\text{脂质体包埋率}/\% = \rho \times V / m \times 100 \quad (1)$$

式中: ρ 为上清液中游离虾青素的质量浓度, $\mu\text{g}/\text{mL}$; V 为上清液的体积, mL; m 为 0.5 mL 虾青素脂质体(质量浓度 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)理论含有的虾青素的质量, μg 。

1.3.3 TEM 测试

将虾青素脂质体用去离子水稀释 50 倍, 然后滴在铜网上, 等样品干燥后再用质量分数 2% 的磷钨酸

染色,干燥 12 h,最后使用 TEM 在 200 kV 电压下观察并拍照^[25]。

1.3.4 XRD 测试

测试虾青素油树脂、虾青素脂质体、大豆卵磷脂的 XRD 谱图^[26]。靶材 Cu,管电压 40 kV,管电流 30 mA,扫描速率 10 (°)/min,扫描范围 $2\theta=10^\circ\sim 60^\circ$ 。实验前对 3 种物质在 -50°C 进行冷冻干燥处理 48 h。

1.3.5 FTIR 测试

采用溴化钾压片法^[26],在 FTIR 上对虾青素油树脂、虾青素脂质体和大豆卵磷脂进行测试,波数范围 $4000\sim 400\text{ cm}^{-1}$,分辨率 4 cm^{-1} ,扫描次数 32 次。

1.4 稳定性测试

通过测试虾青素脂质体的光照和温度稳定性^[27]来评估虾青素的长期储存性。按照 1.2.2 节中实验方法,经测定,制备的虾青素脂质体的虾青素质量浓度为 $1000\text{ }\mu\text{g/mL}$,将 0.1 g 虾青素油树脂溶于 100 mL 无水乙醇即可配制质量浓度 $1000\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的虾青素乙醇溶液。量取两份虾青素脂质体各 5 mL ,置于两个透明玻璃样品瓶中,一个放在 4°C 的环境中,一个放在 25°C 的环境中,保证除温度差异外其他实验条件相同;同时,将两份虾青素乙醇溶液进行同样操作。30 d 后测量 4 份样品中的虾青素保留率。根据式 (2) 计算虾青素保留率 (%) :

$$\text{保留率}/\% = \rho/\rho_0 \times 100 \quad (2)$$

式中: ρ 为 30 d 后虾青素质量浓度, $\mu\text{g/mL}$; ρ_0 为初始虾青素质量浓度, $\mu\text{g/mL}$ 。

1.5 体外释放实验

使用透析袋(截留相对分子质量 3500)进行虾青素脂质体的体外释放研究^[28]。以无水乙醇为释放介质^[29-31]。取 2 mL 虾青素脂质体装入透析袋中,使用封口夹密封透析袋,然后置于 37°C 的 200 mL 无水乙醇中,在 37°C 恒温烘箱中用调速振荡器以 180 r/min 的振荡频率进行 24 h 振荡。每隔一段时间,取出 3 mL 乙醇透析液并加入 3 mL 无水乙醇。根据标准曲线方程计算出虾青素的质量浓度。根据式 (3) 计算虾青素释放率 (%) :

$$\text{释放率}/\% = 200a/b \times 100 \quad (3)$$

式中: a 为释放出虾青素质量浓度, $\mu\text{g/mL}$; b 为初始总虾青素质量, μg 。

1.6 体外消化模拟实验

利用人工胃液、人工肠液模拟虾青素脂质体的消化^[32]。将虾青素脂质体和胃液按体积比 $1:1$ 放置 2 h ;然后,将上述胃液和脂质体混合悬浮液与肠液按体积比 $1:1$ 再放置 2 h 。分别测试胃液处理前、胃液消化后、肠液消化后虾青素脂质体的平均粒径和多分散性系数(PDI),根据平均粒径和 PDI 的变化判断虾青素的消化情况,并通过 TEM 观察其形貌^[33]。

2 结果与讨论

2.1 样品表征

2.1.1 FTIR 分析

图 2 为虾青素脂质体、大豆卵磷脂和虾青素油树脂的 FTIR 谱图。

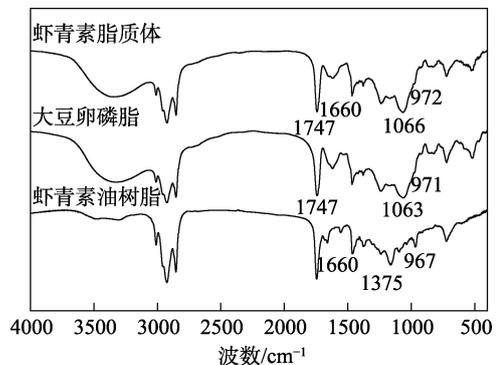


图 2 虾青素脂质体、大豆卵磷脂和虾青素油树脂的 FTIR 谱图

Fig. 2 FTIR spectra of astaxanthin liposomes, soy lecithin and astaxanthin oil resin

从图 2 可以看出,虾青素油树脂在 1660 cm^{-1} 处的吸收峰归属于 $\text{C}=\text{O}$ 键的伸缩振动; 1375 cm^{-1} 处的吸收峰为 $-\text{CH}$ 的对称变形; 967 cm^{-1} 处的吸收峰为 $\text{C}-\text{C}$ 共轭系统中 $\text{C}-\text{H}$ 的伸缩振动^[34]。 1747 、 1063 cm^{-1} 处的吸收峰为 PO_2^- 的对称伸缩, 971 cm^{-1} 处为 $-\text{N}(\text{CH}_3)_3$ 的特征峰,这两处均为大豆卵磷脂的特征峰^[35]。对于虾青素脂质体来说, 1660 cm^{-1} 处为虾青素的特征峰, PO_2^- 和 $-\text{N}(\text{CH}_3)_3$ 的特征吸收峰变宽,同时向更高波数移动,表明虾青素和大豆卵磷脂之间可能存在相互作用^[36],从而促进了虾青素脂质体的形成。

2.1.2 形态形貌分析

图 3 为虾青素脂质体的 TEM 图和实物图。

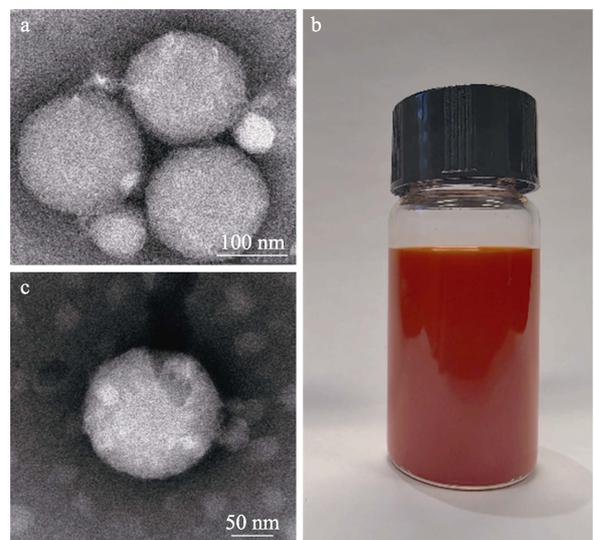


图 3 虾青素脂质体的 TEM (a、c) 和实物 (b) 图
Fig. 3 TEM (a, c) and physical (b) images of astaxanthin liposomes

从图3可以看出, 虾青素脂质体大小均匀, 分散良好, 粒径在200.0 nm左右(图3a、c); 虾青素脂质体外观清澈, 色泽鲜艳(图3b)。

2.1.3 XRD 分析

图4为虾青素油树脂、虾青素脂质体、大豆卵磷脂的XRD谱图。

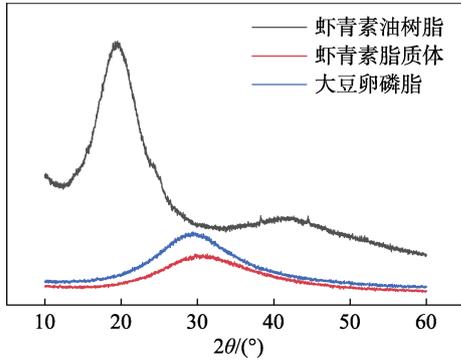


图4 虾青素、虾青素脂质体、大豆卵磷脂的XRD谱图
Fig. 4 XRD patterns of astaxanthin, astaxanthin liposomes and lecithin

从图4可以看出, 虾青素油树脂的衍射峰与虾青素脂质体、大豆卵磷脂均不同。虾青素脂质体的衍射峰与大豆卵磷脂近似, 表明大豆卵磷脂对虾青素油树脂具有很好的包覆效果^[37-38], 掩盖了虾青素油树脂原有的特征衍射峰。

2.2 工艺条件考察

2.2.1 制备压力的影响

图5为制备温度为50 °C时, 制备压力对虾青素脂质体的平均粒径、PDI、Zeta电位和包埋率的影响。

从图5a可以看出, 虾青素脂质体平均粒径在制备压力>10 MPa后显著减小, 降至240.0 nm左右, 在20 MPa时平均粒径最小, 为236 nm; 随着制备压力的升高, 虾青素脂质体的PDI也不断减小。

Zeta电位对确定分散体中颗粒的表面电荷具有重要意义, Zeta电位绝对值>30 mV的颗粒被认为是稳定的^[39]。从图5b可以看出, 当制备压力>12 MPa后, 虾青素脂质体Zeta电位绝对值约60 mV, 表明虾青素脂质体体系稳定, 不易发生凝结或凝聚。

从图5c可以看出, 虾青素脂质体的包埋率随着制备压力的增加呈增大趋势, 在20 MPa时达到了97.18%。这是因为, 制备压力决定了水悬浮液中二氧化碳的溶解量, 随着压力的增加, 水悬浮液中的二氧化碳的溶液量也会增加, 会有更多的二氧化碳分子进入大豆卵磷脂双分子层, 从而使大豆卵磷脂分散并重新聚集成更小的颗粒。此外, 超临界二氧化碳和脂溶性的虾青素之间的亲和力会促进虾青素与大豆卵磷脂结合, 实现更好的封装包覆。

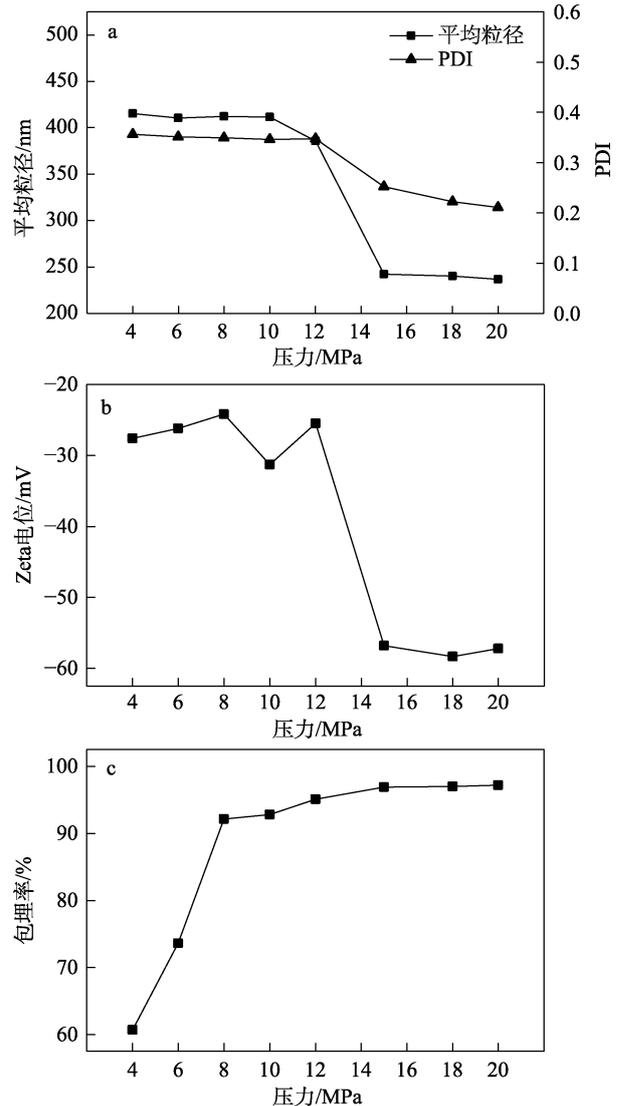


图5 制备压力对虾青素脂质体的平均粒径和PDI (a)、Zeta电位 (b) 及包埋率 (c) 的影响

Fig. 5 Effects of preparation pressure on average particle size and PDI (a), zeta potential (b) and encapsulation efficiency (c) of astaxanthin liposomes

当压力为15 MPa时, 既能够达到较高的包埋率和较好的稳定性, 相对18、20 MPa的压力又能节省很多资源。

2.2.2 制备温度的影响

图6为压力为15 MPa时, 制备温度对虾青素脂质体的平均粒径、PDI、Zeta电位和包埋率的影响。

从图6a可以看出, 随着制备温度的升高, 虾青素脂质体的平均粒径和PDI均呈先减小后增加的趋势。在制备温度50 °C时平均粒径达到了最小值(242.4 nm), 此时的PDI为0.252, 而在制备温度45 °C时PDI达到最小值(0.238)。

从图6b可以看出, 虾青素脂质体的Zeta电位绝对值随着制备温度的升高先减小后增大, 但均在一个稳定的范围内(>30 mV)。

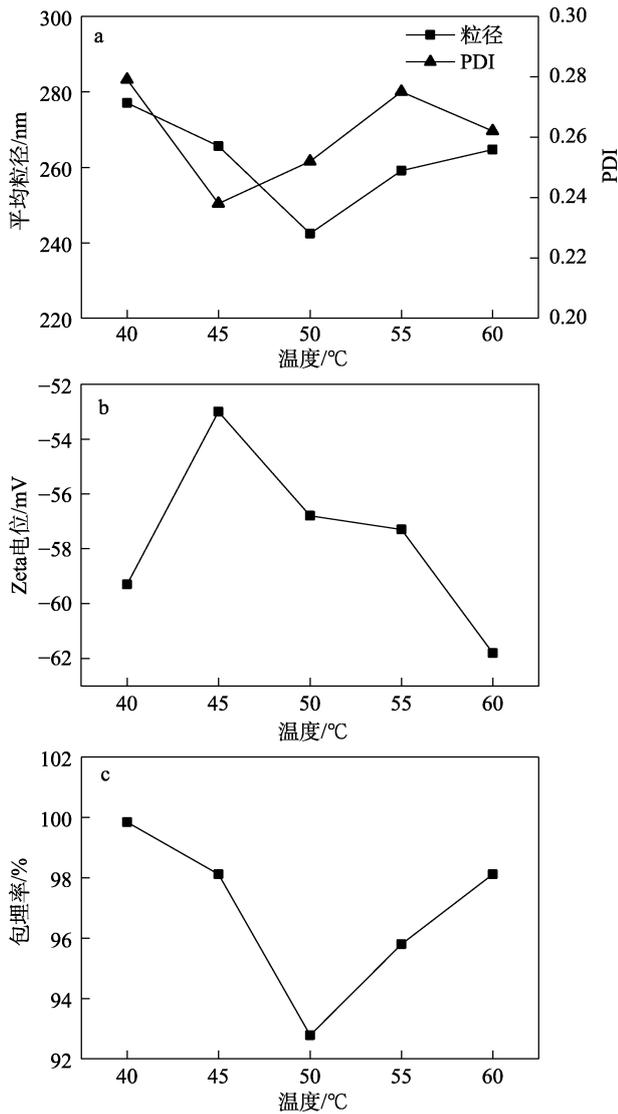


图 6 制备温度对虾青素脂质体的平均粒径和 PDI (a)、Zeta 电位 (b) 及包埋率 (c) 的影响
Fig. 6 Effects of preparation temperature on average particle size and PDI (a), Zeta potential (b) and encapsulation efficiency (c) of astaxanthin liposomes

从图 6c 可以看出, 虾青素脂质体的包埋率随着温度的升高呈先降低后增加的趋势, 包埋率在制备温度 50 °C 时达到了最小值 (92.79%), 温度对水悬浮液的物理性质的影响会间接影响到脂质体的性质。

温度会影响溶液中二氧化碳的溶解度、密度和体积膨胀率, 同时也会影响大豆卵磷脂双分子层的特性, 如流动性、渗透性和虾青素的溶解度等。

高温有利于虾青素的封装包覆, 这是因为, 高温能降低大豆卵磷脂分子间的相互作用, 从而增加大豆卵磷脂分子的溶解度, 以及使大豆卵磷脂双分子层能够在压力的作用下更易分散, 从而更好地与虾青素分子结合。虽然制备温度 40 °C 时包埋率很高, 但此温度下的粒径较大, 同时又因为虾青素在高温下会热解, 所以, 采用 50 °C 作为适宜的制备温度。

2.3 脂质体的稳定性分析

表 1 为虾青素脂质体 30 d 稳定性测试结果。

从表 1 可以看出, 经过 30 d 的储存, 虾青素脂质体在 4 和 25 °C 的虾青素保留率分别为 94.13% 和 89.04%。而虾青素乙醇溶液的虾青素保留率分别为 18.66% 和 10.35%, 虾青素已经大部分发生了降解。结果表明, 虾青素脂质体能够显著增强虾青素的稳定性。

表 1 虾青素脂质体 30 d 稳定性测试结果

Table 1 Stability test results of astaxanthin liposomes after 30 d

样品	虾青素保留率/%	
	4 °C	25 °C
虾青素脂质体	94.13	89.04
虾青素乙醇溶液	18.66	10.35

2.4 体外释放性能分析

图 7 为虾青素脂质体和虾青素乙醇溶液的体外释放曲线。

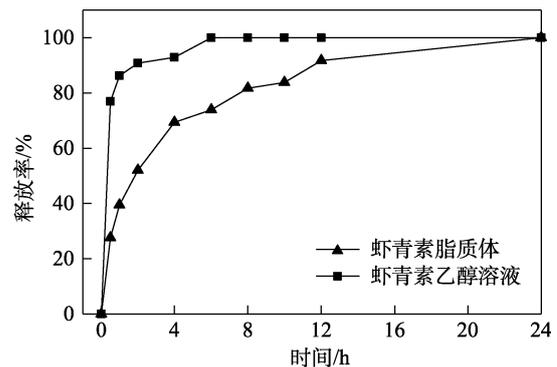


图 7 虾青素脂质体和虾青素乙醇溶液的释放率曲线
Fig. 7 Release rate profiles of astaxanthin liposomes and astaxanthin ethanol solution

从图 7 可以看出, 在释放的前 4 h, 虾青素脂质体释放较快, 总释放率达到 69.3%; 虾青素乙醇溶液 4 h 总释放率为 92.0%, 明显高于虾青素脂质体。随着释放时间的推移, 虾青素乙醇溶液在 6 h 已完成虾青素的 100% 释放, 而虾青素脂质体在 12 h 时的总释放率为 91.0%。可以明显看出, 虾青素脂质体比虾青素乙醇溶液具有更好的缓释效果。

2.5 体外消化模拟分析

表 2 为虾青素脂质体在体外不同消化阶段的平均粒径和 PDI。图 8 为虾青素脂质体经人工胃液、人工肠液消化后的 TEM 图。

从表 2 可以看出, 虾青素脂质体经过胃液消化 2 h 后, 平均粒径由 242.4 nm 增至 652.9 nm, PDI 从 0.252 减小至 0.187; 再经过肠液消化 2 h 后, 平均粒径增至 761.6 nm, PDI 增至 0.205。

从图 8 可以看出, 虾青素脂质体在人工胃液中

会聚集, 同时粒径会变大(图 8a); 经过人工胃液消化后的虾青素脂质体再经过肠液消化会被消化成无定形的形状(图 8b)。

表 2 虾青素脂质体体外不同消化阶段的平均粒径及 PDI
Table 2 Average particle size and PDI of astaxanthin liposomes at different digestion stages *in vitro*

阶段	平均粒径/nm	PDI
起始虾青素脂质体	242.4	0.252
胃液消化后	652.9	0.187
肠液消化后	761.6	0.205

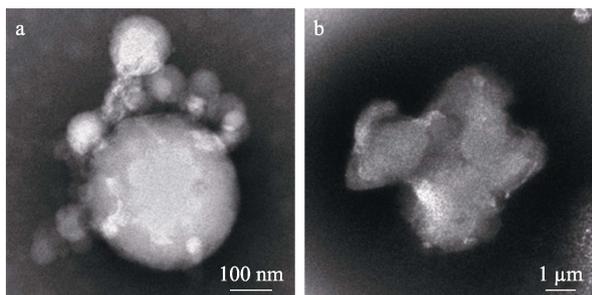


图 8 虾青素脂质体经人工胃液消化(a)和人工肠液消化(b)后的 TEM 图

Fig. 8 TEM images of astaxanthin liposomes after artificial gastric juice digestion (a) and artificial intestinal juice digestion (b)

大豆卵磷脂约 10%的水解发生在胃部, 其余在小肠^[40]。结果表明, 虾青素脂质体能够被人工肠液更好地消化和吸收, 进而提高虾青素的生物利用度。

3 结论

采用超临界二氧化碳制备了大豆卵磷脂包覆的虾青素脂质体。

(1) 压力 20 MPa、温度 50 °C 制备的虾青素脂质体的虾青素包埋率为 97.18%, 经 30 d 储存后, 4 和 25 °C 的虾青素保留率分别为 94.13%和 89.04%。

(2) 体外释放实验表明, 虾青素脂质体具有较好的虾青素缓释效果, 在 4、12 h 的总释放率分别为 69.3%和 91.0%。体外消化模拟表明, 虾青素脂质体在肠道中消化和吸收较强。

本文可为超临界二氧化碳在制备脂质体方面的研究提供数据参考, 后续将尝试用其他脂质进行虾青素脂质体的制备和研究。

参考文献:

[1] LI H M (李浩明), GAO L (高蓝). Astaxanthin: Chemical structure, biological functions and usage[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2003, 20(1): 32-37.

[2] NAGUIB Y M A. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, 48(4): 1150-1154.

[3] ZHOU Q X, YANG L, XU J, *et al.* Evaluation of the physicochemical stability and digestibility of microencapsulated esterified astaxanthins using *in vitro* and *in vivo* models[J]. *Food Chemistry*, 2018, 260: 73-81.

[4] MONTERO P, CALVO M M, GÓMEZ-GUILLÉN M C, *et al.* Microcapsules containing astaxanthin from shrimp waste as potential food coloring and functional ingredient: Characterization, stability, and bioaccessibility[J]. *LWT-Food Science & Technology*, 2016, 70: 229-236.

[5] KRAFT J C, FREELING J P, WANG Z Y, *et al.* Emerging research and clinical development trends of liposome and lipid nanoparticle drug delivery systems[J]. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2014, 103(1): 29-52.

[6] SUN J Y (孙君颖), LU L J (卢莉璟), LU L X (卢立新), *et al.* Preparation of responsive controlled-release antioxidant composite film based on temperature-sensitive liposomes of rosemary essential oil[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2021, 38(8): 1564-1569, 1612.

[7] YAN S (闫森), FAN J (樊君), TAN C L (谭春雷). Preparation of collagenic liposome and its percolation through skin[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2012, 29(6): 576-579.

[8] TAKAHASHI M, UECHI S, TAKARA K, *et al.* Evaluation of an oral carrier system in rats: Bioavailability and antioxidant properties of liposome-encapsulated curcumin[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57(19): 9141-9146.

[9] ISAILOVIĆ B D, KOSTIĆ I T, ZVONAR A, *et al.* Resveratrol loaded liposomes produced by different techniques[J]. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2013, 19: 181-189.

[10] LIU D, HU H Y, LIN Z X, *et al.* Quercetin deformable liposome: Preparation and efficacy against ultraviolet B induced skin damages *in vitro* and *in vivo*[J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2013, 127: 8-17.

[11] ZHAO L S, TEMELLI F, CURTIS J M, *et al.* Encapsulation of lutein in liposomes using supercritical carbon dioxide[J]. *Food Research International*, 2017, 100: 168-179.

[12] BANGHAM A D, STANDISH M, WATKINS J C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1965, 13(1): 238-252.

[13] BATZRI S, KORN E D. Single bilayer liposomes prepared without sonication[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1973, 298(4): 1015-1019.

[14] SZOKA F, PAPAHAJOPOULOS D. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1978, 75(9): 4194-4198.

[15] KUROIWA T, HORIKOSHI K, SUZUKI A, *et al.* Efficient encapsulation of a water-soluble molecule into lipid vesicles using W/O/W multiple emulsions *via* solvent evaporation[J]. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2016, 92: 421-430.

[16] MEURE L A, FOSTER N R, DEGHANI F. Conventional and dense gas techniques for the production of liposomes: A review[J]. *AAPS PharmSciTech*, 2008, 9(3): 798-809.

[17] XU S H (徐少洪), ZHAO B (赵斌), YAN Z Q (闫志强), *et al.* Applications of supercritical fluid technology in preparation of liposome[J]. *Materials Reports (材料导报)*, 2014, 28(5): 98-102.

[18] LIU H (刘辉), PAN W S (潘卫三), ZHOU L L (周丽莉), *et al.* Supercritical fluid technology and its application in pharmaceuticals[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica (药学学报)*, 2006, 41(12): 1123-1129.

[19] OTAKE K, IMURA T, SAKAI H, *et al.* Development of a new preparation method of liposomes using supercritical carbon dioxide [J]. *Langmuir*, 2001, 17(13): 3898-3901.

[20] HE H X (何红霞), WEN Z (文震), CHEN Q (陈庆), *et al.* Preparation of atracylenolide loaded liposome in supercritical carbon dioxide and its characterization[J]. *The Food Industry (食品工业)*, 2017, 38(10): 102-105.

[21] ZHANG Z L (张志丽), ZHANG Z Y (张志云), ZHANG W (张维), *et al.* Optimization of technology for supercritical fluid technology in preparation of curcumin liposome[J]. *Journal of Shenyang Pharmaceutical University (沈阳药科大学学报)*, 2014, 31(2): 81-86, 93.

[22] LI S (李爽), WANG H J (王海君). Preparation of paclitaxel liposome by supercritical carbon dioxide method[J]. *China Pharmaceuticals (中国药业)*, 2011, 20(15): 35-36.

[23] JOPSKI B, PIRKL V, SCHMIDT K. Viscosity measurements of suspensions of hemoglobin-containing liposomes of varying lipid composition[J]. *Biomaterial Artificial Cells and Artificial Organs*, 2009, 18(2): 345-359.

[24] DONG W Y, TANG C Q, XIA M Q, *et al.* Preparation and characterization of egg yolk immunoglobulin loaded chitosan-liposome assisted by supercritical carbon dioxide[J]. *Food Chemistry*, 2022, 369(1): 1-10.