

超临界溶析技术制备玉米蛋白虾青素负载微粒的研究

胡曼¹, 江燕斌¹, 蹇华丽², 宋光均²

(1. 华南理工大学化学与化工学院, 广东广州 510640) (2. 广州元大生物科技发展有限公司, 广东广州 510530)

摘要: 本文以玉米醇溶蛋白为载体材料、二甲基亚砜/二氯甲烷为混合溶剂、超临界二氧化碳为反溶剂, 通过超临界溶析技术制备了虾青素负载微粒。采用 OA16(4⁵) 正交实验探讨了溶剂配比、温度、压力、载体材料浓度和进样流量等影响因素对虾青素负载微粒的包封率、形貌和粒径的影响, 方差分析结果表明适宜操作条件为 DMSO/DCM(1:2, V/V), T=42 °C, P=80 bar, C=3 g/L, F=1.5 mL/min, 在上述条件下, 虾青素负载微粒的包封率为 94.4%、平均粒径为 385.4 nm。SEM 结果表明, 虾青素负载微粒为表面光滑的球形; FT-IR 结果表明经过超临界溶析处理后虾青素的化学结构并没有发生变化; XRD 结果表明虾青素被包裹于载体材料玉米醇溶蛋白中, 实现了载体材料对虾青素隔离保护的作用, 贮存稳定性实验结果表明, 虾青素的稳定性在负载微粒中得到大幅提高。

关键词: 虾青素; 玉米醇溶蛋白; 超临界溶析技术; 负载微粒

文章篇号: 1673-9078(2017)3-139-145

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.3.022

Preparation of Zein Microparticles Loaded with Astaxanthin by a Supercritical Carbon Dioxide Anti-solvent Process

HU Man¹, JIANG Yan-bin¹, JIAN Hua-li², SONG Guang-jun²

(1. School of Chemistry and Chemical Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2. Guangzhou UDA Biotech Development Co., Ltd, Guangzhou 510530, China)

Abstract: Astaxanthin-loaded microparticles were created using a supercritical anti-solvent (SAS) process in this study, with zein as the carrier material, a mixture of dichloromethane and dimethyl sulfoxide as co-solvent, and supercritical carbon dioxide as the anti-solvent. The effects of five operating conditions, i.e., solvent ratio, temperature, pressure, concentration of carrier materials, and solution flow rate, on astaxanthin encapsulation rate, particle morphology, and mass median diameter (Dp₅₀) were investigated using an OA₂₅ (5⁵) orthogonal experimental design. Analysis of variance indicated that the optimal operating conditions were as follows: DMSO/DCM (1:2, V/V), T=42 °C, P=80 bar, C=3 g/L, and F=1.5 mL/min. Under these conditions, the astaxanthin encapsulation rate was 94.4% and Dp₅₀ was 385.4 nm. Scanning electron microscopy (SEM) images showed that most of the particles had a spherical shape with a smooth surface, and Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy suggested that the chemical structure of astaxanthin was not changed after the SAS process. X-ray powder diffraction (XRD) patterns indicated that astaxanthin was embedded completely in zein, and the protective effect of the carrier material on astaxanthin was achieved. The results of storage tests indicated that the stability of astaxanthin was improved significantly after loading.

Key words: astaxanthin; zein; supercritical anti-solvent process; drug delivery system microparticle

虾青素是一种紫红色的类胡萝卜素, 主要来源于雨生红球藻。作为一种世界上最强的抗氧化剂, 近年来, 研究证明, 虾青素具有增强肌体免疫力特性^[1]、抗癌^[2]、抗衰老^[3]和预防心脑血管疾病^[4]等作用, 目前虾青素已被在食品、保健品、化妆品和癌症治疗药物

收稿日期: 2016-04-07

基金项目: 国家自然科学基金项目 (21476086); 广州市科技计划项目 (201601010290)

作者简介: 胡曼(1990-), 女, 研究方向: 制药工程

通讯作者: 江燕斌(1970-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 材料化学工程

等领域得广泛应用。虾青素的抗氧化作用比其它类型的类胡萝卜素更强, 其清除自由基的能力和淬灭单线氧的活性比维生素 E 强 6 倍, 比叶黄素高 10 倍, 是花青素的 17 倍, 因此, 虾青素被称为“超级维生素 E”^[5]。但虾青素是一种高度不饱和分子, 暴露在热、光和氧气时易被分解^[6], 且体内溶解度小和生物利用度低等缺点限制了其应用领域, 因此, 增强其稳定性和体内溶解度成为研究热点。

为克服上述缺点, 研究人员通过化学修饰等方法对虾青素进行了合成和改性并取得了良好的进展^[7],

但出于安全考虑,美国食品与药品管理局(FDA)禁止将化学合成的虾青素添加至食品中。研究表明,克服药物稳定性和生物利用度等缺点最有效的方法是制备药物输送微粒,但传统的药物输送剂型的制备方法如溶剂蒸发法、喷雾干燥和相分离法等,都存在药物降解、粒径分布广、溶剂残留和工艺繁琐等缺陷,而超临界溶析技术具有条件温和、操作简单和重现性好粒径均一等优点,是目前制备药物输送微粒的研究热点^[8]。

玉米醇溶蛋白是一种天然可食性植物大分子,具有可再生性、两亲性、良好的生物相容性和生物可降解性,作为载体材料可有效地提高药物的稳定性和生物利用度等^[9]。本文采用超临界溶析技术,将虾青素负载在玉米醇溶蛋白上,制备出高包封率及粒径均一的虾青素负载微粒,以减少虾青素与外界环境的接触来提高其稳定性,进而达到虾青素的高值高效利用。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂

仪器:超临界溶析实验装置(SAS50-2-ASSYSystem),美国Thar公司;分析天平(JA3003N),上海精密科学仪器设备有限公司;真空干燥箱(DZF-6020),上海一恒科学仪器有限公司;超声波清洗器(KQ5200B),昆山市超声仪器公司;粒度分析仪(Zeta PALS),美国BROOKHAVEN公司;傅里叶红外光谱仪(FT-IR) NicoletNexus 670,美国ThermoElectron公司;扫描电镜(SEM)LEO1530VP,德国LEO公司;紫外分光光度计(UV-2450),日本岛津公司;X射线衍射光谱仪(XRD)D8ADVANCE,德国Bruker公司。

试剂:虾青素,纯度>97.3%,鸡市方晟生物开发有限公司;玉米醇溶蛋白(生化试剂),Sigma-Aldrich上海贸易有限公司;CO₂,纯度>99.9%,广州盛盈气体有限公司;Tween80,纯度>99%,天津科密欧化学试剂有限公司;二甲基亚砜(DMSO)和二氯甲烷(DCM),分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

1.2 实验装置及流程

本文采用的超临界溶析实验装置流程图见图1^[10],CO₂经冷机冷却后,用高压泵送至500 mL的沉降釜中,溶有溶质的溶剂用高压泵通过一个0.5 mm的喷嘴喷入沉降釜中,在该沉降釜喷入与超临界CO₂混合,沉降釜的温度和压力分别由热交换器和背压阀采用计算机在线控制。具体的实验步骤如下:1)在控

制系统中设定相关的实验参数(温度、压力、二氧化碳流量和样品溶液流速等),启动CO₂泵将CO₂泵入沉降釜;2)系统参数稳定后,启动溶剂泵将溶液以特定的流速泵入沉降釜,反溶剂超临界CO₂快速溶解溶液中的溶剂带出高压釜,溶质析出形成细小颗粒;3)实验结束后,继续干燥一段时间以彻底去除残留在颗粒中的溶剂,然后关闭系统,缓慢释放沉降釜内的压力至常压,取出沉降釜,收集所得到的产品,并对产品进行后续表征。

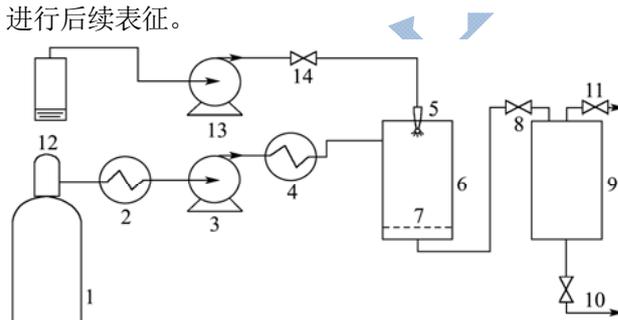


图1 超临界溶析实验装置流程图

Fig.1 Flow diagram of the supercritical anti-solvent process

注:1表示CO₂钢瓶;2表示冷机;3表示CO₂泵;4表示换热器;5表示喷嘴;6表示沉降釜;7表示过滤器;8表示背压阀;9表示降压釜;10表示溶剂排出口;11表示CO₂排出口;12表示料液;13表示溶剂泵;14表示溶剂阀。

1.3 正交实验设计

本文设计了OA₁₆(4⁵)正交实验,通过探讨操作参数对虾青素微粒包封率的影响,以优化超临界溶析技术制备虾青素微粒的操作条件,制备高包封率及粒径均一的虾青素微粒。实验中,固定虾青素的浓度为1 mg/mL,因素和水平的选择是基于前期预实验和文献报道^[8,9,11],考虑到虾青素在高温高压易被分解等不稳定因素,在满足能将虾青素负载在载体材料中的前提下选择温和的实验条件,正交实验的5个因素分别溶剂配比R(DMSO:DCM)、温度T、压力P、载体材料溶度C和溶液流速F,各因素水平数见表1。

表1 正交实验因素水平表

Table 1 Factors and levels of the orthogonal array design

Factors	R/(V/V)	T/°C	P/bar	C/(g/L)	F/(mL/min)
1	2:1	30	80	3	0.5
2	1:1	35	100	5	1.0
3	1:2	38	110	7	1.5
4	3:1	42	120	9	2.0

1.4 虾青素微粒的表征

1.4.1 虾青素微粒包封率的测定

配制虾青素浓度为5~100 μg/mL的一系列DMSO

混合溶液,采用紫外分光光度计测定虾青素在 492 nm 的最大吸光度,线性拟合后的吸光度 (y) 与虾青素的浓度 (x , mg/mL) 的标准曲线见式 (1):

$$y=182.34x-0.0025 \quad (R^2=0.997) \quad (1)$$

式 (2) 是包封率的计算式,计算过程如下:称取定量的样品溶解在 DMSO 中,超声 1 min 后测量其吸光度,并计算出虾青素的含量,重复 3 次,取其平均值。

$$\text{ASTA encapsulation} = \frac{\text{actual loading percentage}}{\text{theoretical loading percentage}} \times 100\% \quad (2)$$

1.4.2 虾青素微粒粒径的测量

采用粒度分析仪测定虾青素原药、玉米醇溶蛋白和负载微粒的微粒粒径和粒径分布,测试前,将定量样品分散在高纯水中,配置成一定浓度的悬浮液,加入两滴 Tween 80 以增强药物颗粒的分散性。超声 3 min 以防止颗粒团聚,每个样品重复测量三次取平均值。

1.4.3 虾青素微粒的形貌表征

采用 SEM 观察虾青素负载微粒的表面形貌,在观察之前,取少量样品颗粒分散在贴有双面胶的金属小圆台上,在氮气保护条件下喷上一层薄薄的铂金,并在 5 kV 的加速电压下观察颗粒的形貌及分散情况。

1.4.4 虾青素微粒的 FT-IR 表征

采用 FT-IR 检测超临界溶剂萃取技术处理前后的虾青素在化学结构上是否有变化。实验前,先将药物放在真空干燥箱中干燥,按一定的比例分别取适量的待测样品及 KBr 颗粒放在研钵中研磨,使得药物颗粒和 KBr 混合均匀。然后压片保证所压的圆片光滑无损,测量从 4000 cm^{-1} 到 400 cm^{-1} 的特征红外吸收光谱。

1.4.5 虾青素微粒包封情况的表征

采用 XRD 分析虾青素、玉米醇溶蛋白、负载微粒、虾青素和玉米醇溶蛋白的物理混合样品的晶型特征,通过样品 XRD 谱图的对比以确定虾青素在玉米

醇溶蛋白中的分布。XRD 测试条件:扫描角度 $0^\circ \sim 90^\circ$,铜靶,工作电流 40 mA、电压 40 kV,步长为 0.02° ,扫描速度为 0.1 s/步 。

1.4.6 虾青素微粒溶剂残留的检测

虾青素微粒溶剂残留的检测方法参见文献^[11]。测得 5 个标准溶液的浓度(Y)及吸收峰面积(A),以浓度为横坐标,面积为纵坐标分别绘制标准曲线,回归得到 DCM 的标准曲线为 $Y=0.00070A$ ($R^2=0.99998$),DMSO 的标准曲线为 $Y=0.00023A$ ($R^2=0.99956$)。准确称量最优组样品 0.1 g,检测样品中 DCM 和 DMSO 的残留浓度。

1.4.7 虾青素样品的稳定性测试

将原药虾青素和虾青素负载微粒分别放在棕色的密封瓶里于 0°C 或者 25°C 下储存,在固定的时间采用紫外分光光度计测定 492 nm 虾青素的吸光度,并计算虾青素的分解率,每次测量重复 3 次,取其平均值。

1.4.8 数据统计分析

所有的测量数据都重复测量三次,结果用平均值和标准偏差来表示,并采用 t 测试(置信区间 $\alpha=0.10$) 进行虾青素包封率和稳定性数据的方差分析($p<0.05$)。

2 结果与分析

2.1 正交优化实验结果

操作参数对超临界溶剂萃取技术制备虾青素微粒有较大影响, $\text{OA}_{16}(4^5)$ 正交实验结果见表 2。可见,虾青素微粒的包封率在 3.6%~94.4% 范围内变化,极差(R)分析结果表明,影响虾青素包封率的主次因素按顺序如下: $T>R>P>F>C$, 最优操作条件为: $R=\text{DMSO}/\text{DCM}(1:2, V/V)$, $T=42^\circ\text{C}$, $P=80 \text{ bar}$, $C=3 \text{ g/L}$, $F=1.5 \text{ mL/min}$ 。在最优操作条件下的虾青素微粒的包封率为 94.4%。数据统计分析结果中,包封率中的不同字母(a~f)表示在 $p<0.05$ 下存在显著差异。

表 2 $\text{OA}_{16}(4^5)$ 正交实验条件和结果^a

Table 2 Orthogonal array design and list of experimental results

Runs	R	T	P	C	F	Encapsulation/%	Fig. No. of SEM
1	1	1	1	1	1	27.23±1.08 ^g	Fig.3(c)
2	1	2	2	2	2	16.03±0.51 ⁱ	
3	1	3	3	3	3	19.40±0.53 ^h	
4	1	4	4	4	4	43.33±3.06 ^d	
5	2	1	2	3	4	3.60±0.30 ^k	Fig.3(d)
6	2	2	1	4	3	27.50±0.50 ^g	
7	2	3	4	1	2	15.57±0.45 ⁱ	
8	2	4	3	2	1	31.63±0.55 ^e	

转下页

接上页						
9	3	1	3	4	2	30.03±0.85 ^{ef}
10	3	2	4	3	1	18.47±0.50 ^h
11	3	3	1	2	4	45.60±0.53 ^c
12	3	4	2	1	3	92.60±0.53 ^a
13	4	1	4	2	3	15.00±1.00 ⁱ
14	4	2	3	1	4	7.63±0.32 ^j
15	4	3	2	4	1	29.40±0.53 ^f
16	4	4	1	3	2	82.43±0.51 ^b
k ₁	26.71	18.99	45.80	35.89	26.78	
k ₂	19.63	17.34	35.38	27.17	35.85	
k ₃	46.69	27.44	22.07	30.88	38.63	
k ₄	33.49	62.75	23.26	32.57	25.25	
R	27.06	45.41	23.73	8.71	13.39	
Optimal	S ₃	T ₄	P ₁	C ₁	F ₃	94.39±1.05

注: ^a用不同字母表示的数据显示出显著差异(n=3, p<0.05)。

2.2 虾青素微粒的粒径和形貌分析

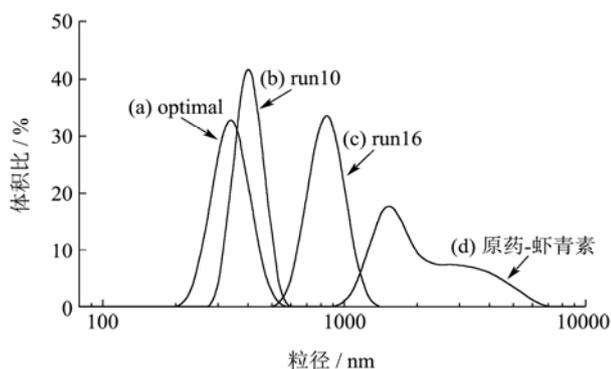


图2 原料和典型样品的粒径分布图

Fig.2 Particle size distributions of raw materials and typical samples

图2是原料和正交实验典型样品的粒径测试结果,可见,原药虾青素的粒径是2363.5 nm,粒径分布宽;而经超临界溶析技术制备的虾青素微粒的粒径分布范围处于200 nm到1000 nm之间,且微粒的尺寸分布较窄,最优组的虾青素微粒的粒径是385.4 nm。

图3是原料和正交实验典型样品的SEM表征结果,可见,虾青素原药和载体材料玉米醇溶蛋白都是不规则、粒径分布宽的颗粒,而超临界溶析技术制备的虾青素微粒是表面光滑,粒径均一的球形颗粒。

从包封率、粒径分布和外观形貌可以看出,当进样量小时,虾青素微粒的粒径小,但包封率低。温度高及压力低时虾青素微粒的包封率较高,这是因为当釜内压力低时,超临界二氧化碳的浓度低,虾青素被超临界二氧化碳带走的少,所以虾青素的包封率高;当沉降釜体内温度高时,釜内的传质速率快,虾青素

快速析出并被玉米醇溶蛋白包裹,同时,釜内温度高也使超临界CO₂的浓度大,所以当釜内温度高时,釜内的传质速率起主导作用,提高了虾青素的包封率。

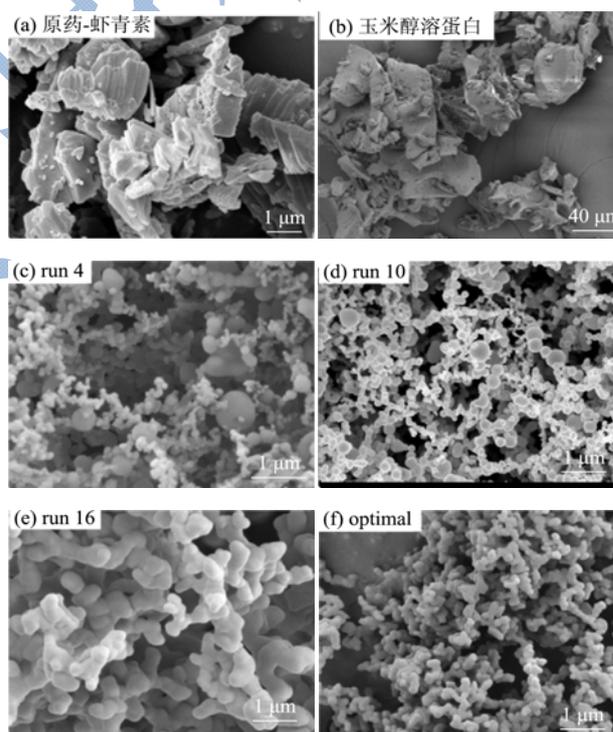


图3 原料和典型样品的SEM图

Fig.3 SEM images of raw materials and typical drug-loaded particles

2.3 虾青素微粒的FT-IR结果

图4是原料虾青素、载体材料玉米醇溶蛋白和经超临界溶析技术处理后的几个典型样品的红外光谱图。如图4b所示,1650.6 cm⁻¹是虾青素结构中的C=O

伸缩振动的特征吸收峰, 1561.3 cm^{-1} 是虾青素六元环中 C=C 伸缩振动的吸收峰, 974.9 cm^{-1} 是虾青素 C-H 伸缩振动的特征吸收峰^[12], 在图 4c~f 中均有虾青素的特征吸收峰。因此, 虾青素经超临界溶析技术处理后特征吸收峰的位置没有发生变化, 表明处理前后药物的化学结构没有发生变化。即经超临界溶析技术过程处理后, 虾青素的疗效不会发生变化。

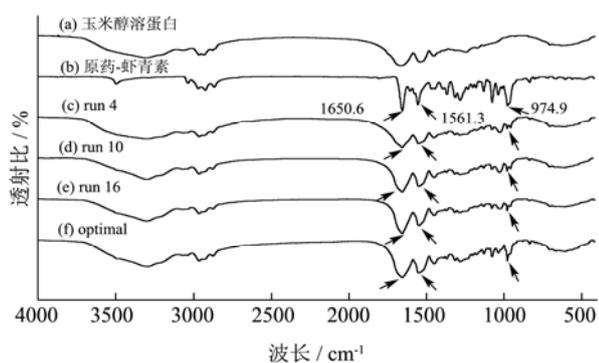


图 4 原料和典型样品的红外光谱图

Fig.4 FT-IR spectra of raw materials and typical drug-loaded particles

图 4a 中 1700~1600 cm^{-1} 、1540~1520 cm^{-1} 和 1300~1220 cm^{-1} 红外吸收峰分别是玉米醇溶蛋白中酰胺键中 C=O 的伸缩振动、C-N 的伸缩振动和 N-H 伸缩振动的吸收峰^[13]。图 4c~f 具有酰胺键的吸收峰, 使得超临界溶析技术制备的虾青素微粒在 1650.6 cm^{-1} 和 1561.3 cm^{-1} 的吸收强度均有增强。对比图 4b~f, 可见虾青素特征吸收峰 974.9 cm^{-1} 随着虾青素包封率的增大而增强。

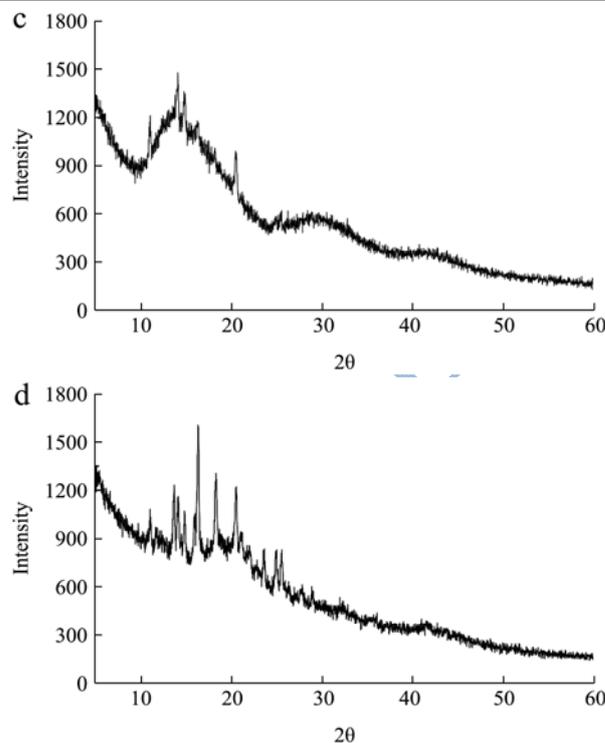
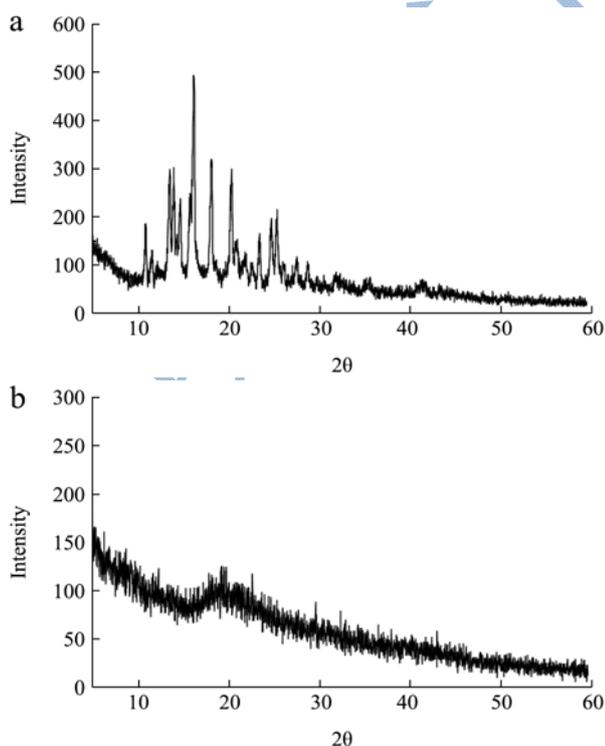


图 5 原料和最优组样品的 XRD 图谱

Fig.5 XRD patterns of raw materials and the optimal sample

注: a, 原药-虾青素; b, 玉米醇溶蛋白; c, optimal; d, 物理混合。

2.4 虾青素微粒的 XRD 结果

图 5 是原药虾青素、载体材料玉米醇溶蛋白和超临界溶析技术处理的最优组、虾青素和玉米蛋白物理混合样品的 XRD 谱图。其中, 虾青素和玉米蛋白物理混合样品中虾青素的比例和最优组中虾青素的比例是相同的。图 5c 表明虾青素在最优组中的结晶度降低, 且虾青素的峰几乎都消失了, 虾青素峰的消失证明虾青素几乎都被玉米醇溶蛋白包裹。虾青素和玉米醇溶蛋白通过物理混合(图 5d)比经超临界溶析技术处理的最优组(图 5c)峰消失的强度弱, 表明经最优组的虾青素的包裹程度比物理混合好, 可见最优组样品虾青素被包裹在玉米醇溶蛋白中^[14], 实现了载体材料对虾青素隔离保护的作用, 从而提高虾青素的稳定性。

2.5 虾青素微粒残留溶剂检测结果

药品生产过程中产生的溶剂残留, 会对人体产生一定的毒性和致癌性, 本文所用的 DCM 是 ICH 规定的二类溶剂(600×10^{-6}), DMSO 是 ICH 规定的三类溶剂(5000×10^{-6})。溶剂残留浓度用 HS-GC 来测量, 根据最优组样品中 DCM 和 DMSO 的峰面积, 由相应的标准曲线计算出样品中 DCM 和 DMSO 的残留浓度分别为 78.47×10^{-6} 和 24.68×10^{-6} , 远低于 ICH 对 DCM 和

DMSO 残留量的规定,说明超临界溶析处理后有机溶剂的残留量非常低,非常适用于医药领域。

2.6 虾青素样品的稳定性测试结果

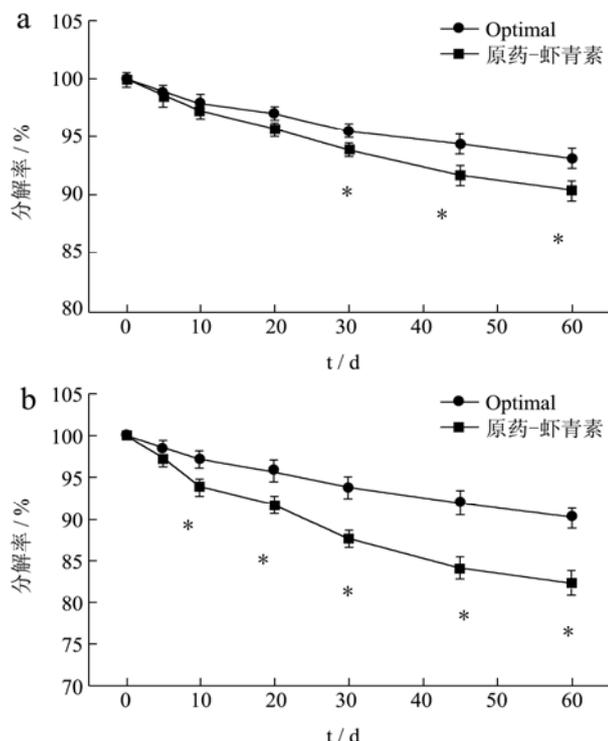


图6 原料和最优组样品的贮存稳定性

Fig.6 Storage stability of raw materials and the optimal sample

注: a, 0 °C; b, 25 °C。t 测试用于每个数据, *表示存在显著差异(p<0.05)。

虾青素的抗氧化活性能力在很大程度上取决于它的贮存稳定性,图6是原药虾青素和虾青素负载微粒分别在0 °C和25 °C的贮存稳定性,可以看出在60 d的贮存时间里,原药虾青素和虾青素微粒贮存于0 °C的稳定性均比25 °C高。图6表明,贮存于0 °C时,原药虾青素60 d分解率为9.64%,而虾青素载药微粒降解率为6.88%;25 °C时,原药虾青素60 d的分解率为17.64%,而虾青素负载微粒的降解率为9.86%。总体上,通过超临界溶析技术负载的虾青素微粒的稳定性比原药虾青素高。因此,通过超临界溶剂技术,将虾青素负载在玉米醇溶蛋白中可提高虾青素的稳定性。

2.7 数据统计分析结果

对包封率数据进行回归分析,表3是虾青素包封率的回归系数,所得多项式见式(3),可以看出温度和压力对虾青素包封率具有显著效应,而溶剂配比、玉米醇溶蛋白的浓度和溶剂流量对虾青素包封率不显著,温度(TT sig.0.000<0.05)、温度和压力的交互作用(TP sig.0.002<0.05)对虾青素包封率具有显著性,这与

正交设计的极差分析相一致。

$$Y=19.157+4.888TT-3.876TP \quad (3)$$

表3 虾青素包封率的多项式回归系数

Table 3 Regression coefficient of polynomial function of

astaxanthin encapsulation rate				
模型	系数	S.D.	t	Sig.
常量	19.157	5.978	3.205	0.007
TT	4.888	0.757	6.457	0.000
TP	-3.876	1.037	-3.738	0.002
回归	6985.981			
残差	2150.564			
总计	9136.546			
R ² =0.874				

3 结论

本文采用超临界溶析技术成功地制备了玉米醇溶蛋白虾青素负载微粒,发现高温低压容易制备出高包封率的虾青素微粒,溶剂配比对虾青素微粒的形貌影响较大。样品表征结果表明,大部分虾青素被包裹在载体材料玉米醇溶蛋白中,从而提高虾青素的稳定性。超临界溶析技术是一个条件温和的物理过程,不会改变虾青素的化学结构,不影响虾青素的药效。基于过程参数对负载微粒的包封率、微粒形貌和粒径分布的影响分析,获得了适宜的操作条件,在适宜操作条件下,所制备的虾青素负载微粒为球形,平均粒径为385.4 nm,虾青素的包封率>94%。与原药相比,玉米蛋白负载微粒中虾青素的稳定性得到大幅提高。

参考文献

- [1] Park J S, Chyun J H, Kim Y K, et al. Astaxanthin decreased oxidative stress and inflammation and enhanced immune response in humans [J]. Nutrition and Metabolism, 2010, 7(1): 1-10
- [2] Kurihara H, Koda H, Asami S, et al. Contribution of the antioxidative property of astaxanthin to its protective effect on the promotion of cancer metastasis in mice treated with restraint stress [J]. Life Sciences, 2002, 70(21): 2509-2520
- [3] Kidd P. Astaxanthin, cell membrane nutrient with diverse clinical benefits and anti-aging potential [J]. Altern. Med. Rev., 2011, 16(4): 355-64
- [4] Pashkow F J, Watumull D G, Campbell C L. Astaxanthin: a novel potential treatment for oxidative stress and inflammation in cardiovascular disease [J]. The American Journal of Cardiology, 2008, 101(10): S58-S68
- [5] Naguib Y M A. Antioxidant activities of astaxanthin and

- related carotenoids [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, 48(4): 1150-1154
- [6] Ambati R R, Phang S M, Ravi S, et al. Astaxanthin: Sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications-A review [J]. *Marine Drugs*, 2014, 12(1): 128-152
- [7] An G H, Song J Y, Chang K S, et al. Pigmentation and delayed oxidation of broiler chickens by the red carotenoid, astaxanthin, from chemical synthesis and the yeast, *Xanthophyllomyces dendrorhous* [J]. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*, 2004, 17(9): 1309-1314
- [8] Huang Y, Wang H, Liu G, et al. New polymorphs of 9-nitro-camptothecin prepared using a supercritical anti-solvent process [J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2015, 496(2): 551-560
- [9] Wang W, Liu G, Wu J, et al. Co-precipitation of 10-hydroxycamptothecin and poly (l-lactic acid) by supercritical CO₂ anti-solvent process using dichloromethane/ethanol co-solvent [J]. *The Journal of Supercritical Fluids*, 2013, 74: 137-144
- [10] 刘贵金,汪红娣,江燕斌.玉米醇溶蛋白用作药物输送系统载体的研究进展[J].*化工学报*,2013,64(10):3493-3504
- LIU Gui-jin, WANG Hong-di, JIANG Yan-bin. Rresearch progress of zein used as the carrier in drug delivery system [J]. *Journal of Chemical Engineering*, 2013, 64(10): 3493-3504
- [11] Liu G, Wang H, Jiang Y. Recrystallization and micronization of camptothecin by the supercritical antisolvent process: influence of solvents [J]. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2013, 52(43): 15049-15056
- [12] Dong S, Huang Y, Zhang R, et al. Inclusion complexes of astaxanthin with hydroxypropyl- β -cyclodextrin: Parameters optimization, spectroscopic profiles, and properties [J]. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2014, 116(8): 978-986
- [13] Budevska B O, Sum S T, Jones T J. Application of multivariate curve resolution for analysis of FT-IR microspectroscopic images of in situ plant tissue [J]. *Applied Spectroscopy*, 2003, 57(2): 124-131
- [14] Xia F, Hu D, Jin H, et al. Preparation of lutein proliposomes by supercritical anti-solvent technique [J]. *Food Hydrocolloids*, 2012, 26(2): 456-463