葛根素与卵磷脂囊泡的相互作用

奚菊群 郭 荣*

(扬州大学化学化工学院, 扬州 225002. * 联系人, E-mail: guorong@yzu.edu.cn)

摘要 通过紫外可见光谱、红外光谱、Zeta电势和量子力学从头算等方法研究了生理条件下(pH 7.4) 葛根素与卵磷脂囊泡的相互作用. 结果表明, 在卵磷脂囊泡体系中, 葛根素能与囊泡发生显著的相互作用, 葛根素主要以分子中的B环部分定位于囊泡的疏水微区中, 并且卵磷脂体系有利于葛根素分子的酸碱平衡向去质子化的方向移动. 葛根素分子上的羟基与磷脂分子的极性头基在膜/水界面上形成的氢键结构增强了卵磷脂双层膜的规整性和稳定性, 从而导致磷脂膜的流动性和渗透性的降低.

关键词 卵磷脂 囊泡 葛根素 药物包埋

囊泡是由两亲分子组成的闭合双层膜, 是与细胞膜结构最为相似的表面活性剂缔合结构, 近年来作为药物载体、生物膜模型和发展仿生技术的模拟体系得到了广泛的研究^[1,2]. 通常认为疏水性的药物能够进入囊泡的双层膜, 而亲水性的药物可以包封在囊泡内部的亲水核中. 囊泡作为药物载体, 可生物降解, 可与细胞亲和, 可与组织相容, 在人体中无毒性, 可无免疫原性, 具有一定程度的靶向性、缓释性, 可以提高药物的稳定性, 降低药物的毒性, 因此卵磷脂囊泡是一种很有前途的药物传递系统. 在提高卵磷脂囊泡性能的研究中, 通常会忽略需要包埋的药物分子本身与囊泡的相互作用对囊泡性质的影响, 因此研究药物与囊泡体系之间的相互作用对于卵磷脂囊泡作为药物载体的设计和应用具有重要的指导意义^[3,4]. 本文报道选择一种黄酮类化合物——葛根素作为包埋药物, 探讨其与卵磷脂囊泡的相互作用.

黄酮类化合物是广泛存在于多种植物中的一大类化合物, 是色原烷的衍生物, 其特点是具有C6—C3—C6的基本骨架, 并可根据中间吡喃环的不同氧化水平和取代方式的差异, 而分为黄酮类、黄酮醇类、异黄酮类、查尔酮类、花青素类以及上述各类的二氢衍生物^[5]. 葛根素(puerarin, 图 1)是豆科植物野葛(*puerarinlobata*)及甘葛藤(*puerarinthomsonii*)根中提取的一种黄酮苷, 具有降低血管阻力, 改善脑及冠脉循环, 降低心肌耗氧量等作用. 研究表明, 葛根素能够有效地清除氧自由基和抗氧化性损伤^[6,7], 能够抑制 β -葡萄糖苷酸酶和雌激素的作用^[8]. 葛根素还对

癌细胞具有一定的抑制作用^[9]. 在许多囊泡作为药物载体的研究中, 人们容易忽略药物分子对囊泡膜相的影响, 但实际上药物分子的加入和囊泡之间存在各种相互作用, 使得囊泡的结构和性质发生一定程度的改变, 进而影响到囊泡对药物分子的预期包埋效果. 葛根素分子已经在临床医学上取得了成功的应用, 但也存在着缺点, 如水溶性低, 口服吸收较差, 生物利用度低. 因此, 我们选择葛根素作为被卵磷脂囊泡包埋的药物分子, 研究了葛根素对卵磷脂囊泡体系结构和性质的影响. 通过紫外可见光谱、红外光谱、Zeta电势和量子力学从头算等实验测试手段和计算方法测定了包埋了葛根素的卵磷脂囊泡的流动性、疏水性和渗透性, 并研究了葛根素分子在包埋后的结构和性质的变化, 为开发葛根素的脂质体类药物、增加葛根素的生物利用度提供了有意义的信息.

图 1 葛根素的结构式

1 实验

() 试剂. 卵磷脂(egg phosphatidylcholine(PC),

生物试剂, 北京市海淀区微生物培养基制品厂), 葛根素(puerarin (H_2Pu), 南京化学试剂开发有限公司, HPLC>98%), 芘(pyrene, Sigma-Aldrich Chemical Co., 99%), 钙黄绿素(AR, 天津市科密欧化学试剂开发中心), 1-苯氨基萘-8-磺酸铵(ANS, Acros Organics, 97%), 所用水均为二次蒸馏水。

() 卵磷脂囊泡的制备。取卵磷脂的氯仿溶液, 倒入 50 mL 圆底烧瓶中置于旋转蒸发器上, 用水泵减压和加热(30)干燥, 在烧瓶内壁形成均匀薄膜。于室温下继续减压蒸发 3 h, 除去残余溶剂。加入磷酸盐缓冲液(PBS), 在氮气保护下, 利用 CQ250 型水浴超声发生器(上海超声波仪器厂, 220 V, 50 Hz)超声 2 h, 所得混悬液即为脂质体。

() 透射电子显微镜的拍摄。采用负染色法透射电子显微镜(TECNAI-12 TEM, Philips)对囊泡进行了观测。将囊泡体系与 0.5%醋酸双氧铀乙醇溶液按体积比 2:1 混合, 得到的溶液滴于覆有Formvar膜的铜网上, 多余溶液立即用滤纸吸掉, 铜网自然干燥 30 min后进行电子显微镜观测^[10]。

() 紫外可见和红外光谱测定。于 5 mL 具塞刻度试管中依次加入葛根素溶液以及卵磷脂囊泡溶液, 定容到刻度并混匀。平衡 30 min 后, 以蒸馏水为参比, 用 UV-2550 紫外分光光度计(日本岛津), 经严格的基线校正后, 在波长 200~450 nm 范围内测定其吸收光谱, 记录特定的峰位置和峰强度。葛根素在卵磷脂囊泡中的红外光谱的测定使用液池法(布鲁克 Equinox 55 红外光谱仪), 在 800~3000 cm^{-1} 内记录溶液光谱。

() 囊泡 Zeta 电势的测定。将定量的囊泡溶液滴加到石英样品池中, 由仪器自动测定其 Zeta 电势。每个样品检测 5 次并取其平均值。所用仪器为 JS-94H 型微电泳仪(华东师范大学监制)。

() 分配系数 K_d 的测定。葛根素在卵磷脂囊泡相和水连续相之间的分配系数 K_d 可以通过荧光猝灭的方法求得^[11,12]。本文选用芘分子作为荧光探针, 由于该探针的亲油性强, 很容易进入磷脂的双层膜, 故可以根据包埋进磷脂囊泡疏水微区的药物分子对探针产生的荧光猝灭作用进行分配系数的测定:

$$\frac{1}{(F_0/F)-1} = \frac{K_d}{[PC]_{tot}} \frac{1}{[puerarin]} + \frac{1}{[PC]_{tot}}, \quad (1)$$

式中 F_0 和 F 分别为加入猝灭物质(葛根素)前后所测得的荧光探针的荧光强度值, 以 $1/((F_0/F)-1)$ 对

$1/[puerarin]$ 作图, 可以得到一条直线, 根据斜率和截距可以求得葛根素在卵磷脂囊泡相和水连续相之间的分配系数 K_d 。

() 量子力学计算。葛根素的电子结构计算采用高斯(Gaussian) 03 软件, 用密度泛函理论(DFT)的方法进行, 分子的优化结构在 B3LYP/6-31G(d)水平上得到。

() 卵磷脂囊泡流动性的测定。配制芘溶液, 将其加入到脂质体混悬液中, 使其最终浓度为 1.2×10^{-6} mol/L。测量探针分子芘在脂质体中加入葛根素前后其偏振度的变化, 可借以表征脂质体双层膜流动性的变化。荧光偏振的测量在 RF-5310PC 荧光光谱仪的激发和发射光路中插入偏振滤光片进行, 将发射偏振器平行于和垂直于激发偏振器时所求得的强度 $I_{//}$ 和 $I_{\perp}$ 组合, 按下式可求得稳态偏振值^[13]:

$$P = [I_{//} - I_{\perp}] / [I_{//} + I_{\perp}], \quad (2)$$

发射波长为 373 nm, 激发波长为 338 nm。

() 卵磷脂囊泡疏水性的测定。将一定量的葛根素溶液和ANS溶液加入到卵磷脂囊泡中, 使ANS的最终浓度为 7.5×10^{-5} mol/L, 放置 1 h后, 固定激发波长为 350 nm, 发射波长为 480 nm, 测量ANS荧光强度的变化, 来判断在加入葛根素前后卵磷脂囊泡膜脂区疏水性的变化^[14,15]。

() 卵磷脂囊泡通透性的测定。根据钙黄绿素在稀溶液中荧光强度与浓度成正比, 在较高浓度时, 其荧光发生自猝灭的特征, 以钙黄绿素为水溶性标记物, 测定脂质体膜的通透性。脂质体通透性可以钙黄绿素的渗透的百分率 R 表示^[16]:

$$R(\%) = 100 [I_f - I_0] / [I_{\infty} - I_0], \quad (3)$$

式中, I_f 为泄漏出的钙黄绿素荧光强度, I_0 为实验开始时的初始荧光强度, 该实验中通过加入一定量的 $CoCl_2$ 溶液对未被包封进脂质体的钙黄绿素进行猝灭, 然后记录背景荧光强度。 I_{∞} 为加入 Triton X-100 (最终浓度为 3 g/kg 左右)使膜结构完全破坏后测得的总荧光强度。利用荧光光谱仪测量卵磷脂囊泡中渗透出的钙黄绿素的荧光强度, 激发波长为 490 nm, 在 520 nm 处记录钙黄绿素的发射强度。

2 结果与讨论

2.1 葛根素与卵磷脂囊泡上的结合

图2为卵磷脂囊泡的负染色透射电子显微镜照片, 可以明显地看出卵磷脂分子形成了单室囊泡, 囊泡

粒径在50~100 nm, 且有部分囊泡相互发生融合. 葛根素是二元弱酸, 其 pK_1 和 pK_2 分别为 6.91, 9.93^[17]. 在 PBS(pH 7.4)缓冲溶液中, 75%的葛根素分子带有负电荷, 其在紫外可见光区有 3 个比较明显的吸收峰, 分别在 345, 306 和 260 nm 左右(图 3 曲线 1). 其中 345 nm 处的吸收峰为葛根素负离子的特征吸收峰, 306 nm 处的吸收峰为葛根素中性分子的特征吸收峰^[17,18]. 在卵磷脂囊泡体系中, 葛根素的酸碱平衡发生了明显的变化, 反映在可见光谱上(图 3 曲线 2 和 3), 345 nm 处的吸收峰强度增强, 306 nm 处的吸收峰强度减弱, 在 315 nm 处出现一个等吸收点. 该等吸收点的出现表明, 葛根素与卵磷脂囊泡可以发生显著的作用, 且与 PBS 缓冲溶液相比, 卵磷脂体系更有利于葛根素分子以碱的形式存在.

Zeta 电势给出了葛根素与卵磷脂囊泡相互作用的更多信息. 由表 1 可见, 在 pH 为 7.4 的缓冲溶液中, 纯的囊泡的 Zeta 电势为 -17.5 mV, 说明纯的卵磷脂囊泡带负电荷, 且在囊泡之间存在微弱的静电相斥作用, 这一结果与文献报道一致^[19]. 从表 1 中可以发现, 随着葛根素的加入, 囊泡的负 Zeta 电势从 17.5 mV 增

图 2 卵磷脂囊泡的电子显微镜照片
卵磷脂浓度为 0.25 mg/mL

图 3 葛根素在卵磷脂囊泡体系中的紫外吸收光谱
葛根素浓度为 3.0×10^{-5} mol/L, 卵磷脂浓度(mg/mL)为 1: 0; 2: 0.10; 3: 0.25

加到 32.2 mV. 在 PBS(pH 7.4)缓冲溶液中, 75%的葛根素分子带有负电荷, 带电的葛根素分子在卵磷脂囊泡上的吸附可以增加卵磷脂分子中的磷酸盐的负电性, 从而增加了囊泡的绝对 Zeta 电势值. 基于荧光猝灭方法求得的葛根素在卵磷脂囊泡相和水连续相之间的分配系数 K_d ($K_d = 55.8 \mu\text{mol/L}$) 不仅仅代表葛根素进入磷脂双层膜疏水微区的量, 也包括葛根素在磷脂膜表面上的吸附. 前人的研究表明黄酮分子与磷脂膜之间相互作用的强度随着分子上酚羟基数目的增加而增加^[20]. 我们所研究的葛根素分子具有疏水的苯环和两个酚羟基. 因此, 该药物分子能够进入与卵磷脂囊泡的疏水微区并在磷脂膜表面上产生吸附, 与磷脂囊泡发生显著的作用.

葛根素以分子中的哪个部位与卵磷脂囊泡发生结合, 对于其药物分子整个的电子结构及抗氧化能力都具有重要的影响. 我们通过量子化学从头算方法对葛根素分子进行研究发现, 葛根素分子及其电离形式的稳定结构都是非平面的(图 4), 对于整个分子,

表 1 25 条件下卵磷脂囊泡中荧光偏振值 P 和 Zeta 电势随葛根素含量的变化^{a)}

样品	$c_{\text{puerarin}}/\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	ζ/mV	P
1	0	-17.5	0.119
2	1.0×10^{-5}	-24.6	0.124
3	2.0×10^{-5}	-27.8	0.132
4	3.0×10^{-5}	-30.1	0.141
5	4.0×10^{-5}	-32.2	0.154

a) 卵磷脂浓度为 0.25 mg/mL

图4 葛根素的优化结构式

(a) 单电离形式(HPu⁻); (b) 双电离形式(Pu²⁻)

B环通过一个C—C单键与A—C环平面相连, 两个平面之间的夹角分别为 38.59° [17] (H₂Pu), 33.44° (HPu⁻) 和 35.86° (Pu²⁻)。另一方面葛根素分子中糖基的存在增加了分子的空间位阻及亲水性, 因此我们可以初步推断, 葛根素分子最可能通过分子中的B环插入磷脂的疏水微区与囊泡进行作用。葛根素分子在囊泡中的红外光谱研究进一步证实了其B环定位于囊泡的机理。图5显示了葛根素分子在 $1400\sim 2300\text{ cm}^{-1}$ 波数范围内的红外光谱, 由图可见, 葛根素分子在 1627 和 1588 cm^{-1} 处有两个较强的振动吸收峰, 分别对应于分子中C=O的伸缩振动和苯环的骨架振动。当葛根素分子增溶于囊泡中后, C=O的伸缩振动峰移向了较低的频率, 并且峰强度增加, 最终, 这个峰覆盖了苯环在 1588 cm^{-1} 处的骨架振动峰, 并在 1609 cm^{-1} 处形成

图5 葛根素在卵磷脂囊泡体系中的红外光谱图

葛根素浓度为 $5.0\times 10^{-3}\text{ mol/L}$, 卵磷脂浓度(mg/mL)为 1: 0; 2: 0.10; 3: 0.15; 4: 0.20; 5: 0.25

了一个宽峰(图3曲线2~5)。我们知道, 随着分子平面性的增加和 π 共轭体系的延展, C=O的伸缩振动峰会向低频移动, 并且峰强度也会增加 [21]。葛根素分子在卵磷脂囊泡中红外光谱的这些变化进一步证实了上述关于其通过B环部分与囊泡结合的推论。随着葛根素分子以B环部分增溶于卵磷脂囊泡中, B环的旋转受到了限制, 整个分子的平面性增加, 因此造成了其振动光谱的上述变化。

2.2 葛根素对卵磷脂囊泡物理性质的影响

脂质体双分子膜的物理性质常常会受到添加物的影响, 如维生素C, 维生素E, β -胡萝卜素等。我们考察了葛根素的加入对脂质体双分子膜物理性质的影响。在低黏滞性或非玻璃态溶液中, 在分子的激发态寿命期内, 荧光发色团的旋转运动能够改变发射跃迁距的取向, 从而导致发射荧光的振子系统偏离原有的方向, 使荧光发生去偏振。这种荧光的去偏振作用, 可用线偏振的Perrin公式来表达 [22]:

$$1/P - 1/3 = (1/P_0 - 1/3)(1 + KT\tau/\eta V), \quad (4)$$

式中 P_0 是当体系中不发生分子旋转及发光分子与相邻分子间无相互作用(如能量转移或迁移)的条件下的极限偏振值, K 和 T 则分别为Boltzman常数和绝对温度, τ 是荧光寿命, V 是分子体积, η 是发光分子的环境黏度。因此, 如已知 P_0 及 τ 值, 并估计出在溶液中发光分子的体积 V , 可按测得的 P 值算出探针分子所处的环境黏度。目前人们借助于能够敏感地进入分析区域的荧光探针, 将荧光偏振技术广泛地用来研究天然的或人工的膜脂区的流动性 [13]。本研究利用芘作为荧光探针, 由于该探针的亲油性较强, 很容易进入类脂双层膜中, 故而可以研究脂质体膜在加入葛根素前后的偏振度(P), 借以表征脂质体膜流动性的变化。实验结果如表1所示。随着葛根素浓度的增加, 偏振值从0.119增加到0.154, P 的增加表明磷脂膜的微黏度增加, 流动性减小。如前面所述, 葛根素与卵磷脂双层膜的结合使得卵磷脂分子中磷酸盐的负电性增加, 这会造成卵磷脂分子之间的静电相斥作用增强, 也会导致囊泡双层膜规整性和稳定性的降低, 使得膜区流动性能增强。然而此推论与表1中所得结果相矛盾, 出现这种现象的原因可能为葛根素和卵磷脂分子之间还存在另外一种作用方式。实验结果表明, 葛根素能够进入与卵磷脂囊泡的疏水微区

并在磷脂膜表面上产生吸附,这种方式归于葛根素与卵磷脂分子之间的非极性作用.另外有研究表明黄酮分子具有很强的形成氢键的能力^[23].葛根素分子上的羟基和磷脂分子的极性头可以在膜/水界面上发生极性作用,形成氢键.正是这种在膜/水界面上形成的氢键结构增强了卵磷脂双层膜的规整性和稳定性,从而降低了囊泡的流动性,使得更多的葛根素分子趋向于采用形成氢键的方式与卵磷脂分子发生作用.与疏水的非极性作用相比较,氢键作用在葛根素与卵磷脂分子的作用过程中起了主导作用.

ANS(1-苯氨基萘-8-磺酸铵)是一种典型的探针分子,对研究对象的疏水区域有特别的亲合作用. ANS 荧光物质在水溶液中的荧光很弱,与脂膜结合后,荧光强度显著增强.图 6 为脂质体膜在加入葛根素前后的 ANS 荧光光谱图.由图 6 可见,随着葛根素的加入,ANS 的荧光强度增加.这一结果表明更多的 ANS 分子能够在膜相中存在,从而使得 ANS 的荧光强度增强,也表明葛根素的加入增强了囊泡双层膜的疏水性.如前所述,膜/水界面上形成的氢键结构能增强卵磷脂双层膜的规整性和稳定性,改变卵磷脂囊泡结构中分子的排列方式,使其排列趋密,并且使得膜相中水的含量降低,从而导致 ANS 的荧光强度增强,囊泡双层膜的疏水性增加,更有利于疏水性药物葛根素在囊泡膜相中的包埋.

为了研究葛根素对卵磷脂囊泡膜渗透性的影响,测定了囊泡中水溶性标记物钙黄绿素随时间的泄漏.

图 6 ANS 荧光法测定卵磷脂囊泡体系的疏水性能
卵磷脂浓度为 0.25 mg/mL

素的泄漏随时间的变化.由图 7 可见,随着葛根素浓度的增加,钙黄绿素的泄漏明显降低.葛根素的浓度为 5.0×10^{-5} mol/L 的囊泡,在 60 min 时钙黄绿素的泄漏量比相同未加葛根素的囊泡降低了 5%. 此结果说明,葛根素与囊泡双层膜的相互作用,使得脂质体膜相中磷脂分子之间的空间距离减小,从而降低了被包埋的钙黄绿素的泄漏.因此,在对葛根素进行药物包埋时,不仅需要考虑葛根素分子的包埋量,还要考虑葛根素分子在药物载体卵磷脂囊泡中的定位对药物释放的影响,从而才能够得到所需葛根素分子的药效.

图 7 卵磷脂囊泡体系中钙黄绿素的释放百分率随时间的变化

卵磷脂浓度为 0.25 mg/mL, 葛根素浓度(mol/L)为 1: 0;
2: 3.0×10^{-5} ; 3: 5.0×10^{-5}

3 结论

葛根素通过疏水作用和氢键作用与卵磷脂囊泡发生相互作用,并使得葛根素的酸碱平衡向去质子化的方向移动.葛根素分子中的羟基与磷脂分子极性头基在膜/水界面形成的氢键作用可以增强囊泡的稳定性,从而使得囊泡双层膜区微黏度和疏水性的增加.以钙黄绿素为标记物研究卵磷脂囊泡的释放行为,钙黄绿素泄漏百分率 R 随着葛根素浓度的增加而减小,表明葛根素与磷脂囊泡的相互作用,能够引起囊泡双层膜通透性的降低.与疏水作用相比较,氢键作用在葛根素与卵磷脂囊泡相互作用中起主导作用.

图7为包埋在不同葛根素浓度下卵磷脂囊泡中钙黄绿素doi/10.1360/csb2007-52-17-1997

参 考 文 献

- 1 Chen H, MacDonald R C, Li S, et al. Lipid encapsulation of arsenic trioxide attenuates cytotoxicity and allows for controlled anti-cancer drug release. *J Am Chem Soc*, 2006, 128(41): 13348—13349[DOI]
- 2 Kitaeva M V, Menger F M, Yaroslavov A A, et al. Membrane transport of a polyacid-tied doxorubicin. *Langmuir*, 2004, 20(16): 6796—6799[DOI]
- 3 Lasic D D, Papahadjopoulos D. Liposomes and biopolymers in drug and gene delivery. *Curr Opin Solid St M*, 1996, 1(3): 392—400[DOI]
- 4 Lasic D D. Recent developments in medical applications of liposomes: Sterically stabilized liposomes in cancer therapy and gene delivery in vivo. *J Control Release*, 1997, 48(2-3): 203—222[DOI]
- 5 Hertog M G L, Hollman P C H, Katan M B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the netherlands. *J Agric Food Chem*, 1992, 40(12): 2379—2383[DOI]
- 6 Zhu J H, Wang X X, Chen J Z, et al. Effects of puerarin on number and activity of endothelial progenitor cells from peripheral blood. *Acta Pharmacol Sin*, 2004, 25(8): 1045—1051
- 7 Cervellati R, Renzulli C, Guerra M C, et al. Evaluation of antioxidant activity of some natural polyphenolic compounds using the briggs-rauscher reaction method. *J Agric Food Chem*, 2002, 50(26): 7504—7509[DOI]
- 8 Benlhabib E, Baker J I, Keyler D E, et al. Effects of purified puerarin on voluntary alcohol intake and alcohol withdrawal symptoms in P rats receiving free access to water and alcohol. *J Med Food*, 2004, 7(2): 180—186[DOI]
- 9 丁丽, 杨轶, 韩绍洲. 葛根素输液制剂及其制备方法. 中国专利, CN1249178, 2004
- 10 Xi J Q, Guo R. Interactions of hemoglobin with lecithin liposomes. *Colloid Polym Sci*, 2006, 284(10): 1139—1145[DOI]
- 11 Verkman A S. The quenching of an intramembrane fluorescent probe. A method to study the binding and permeation of phloretin through bilayers. *Biochim Biophys Acta*, 1980, 599(2): 370—379[DOI]
- 12 Dijk V C, Driessen A J M, Recourt K. The uncoupling efficiency and affinity of flavonoids for vesicles. *Biochem Pharmacol*, 2000, 60(11): 1593—1600[DOI]
- 13 Liu W Y, Guo R. The interaction between morin and CTAB aggregates. *J Colloid Interf Sci*, 2005, 290(2): 564—573
- 14 Yokouchi Y, Tsunoda T, Imura T, et al. Effect of adsorption of bovine serum albumin on liposomal membrane characteristics. *Colloids Surf B*, 2001, 20(2): 95—103[DOI]
- 15 Sujatha J, Mishra A K. Effect of ionic and neutral surfactants on the properties of phospholipid vesicles: Investigation using fluorescent probes. *J Photoch Photobio A*, 1997, 104(1-3): 173—178[DOI]
- 16 Yokoyama S, Takeda T, Abe M. Preparation of ganglioside GM₃ liposomes and their membrane properties. *Colloid Surf B*, 2003, 27(2-3): 181—187[DOI]
- 17 Xi J Q, Guo R. Acid-base equilibrium of puerarin in CTAB micelles. *J Pharm Biomed Anal*, 2007, 43(1): 111—118[DOI]
- 18 Engelmann M D, Hutcheson R, Cheng I F. Stability of ferric complexes with 3-hydroxyflavone (flavonol), 5,7-dihydroxyflavone (chrysin), and 3', 4'-dihydroxyflavone. *J Agric Food Chem*, 2005, 53(8): 2953—2960[DOI]
- 19 Gu Q, Zou A H, Guo R, et al. Effects of a bolaamphiphile on the structure of phosphatidylcholine liposomes. *J Colloid Interf Sci*, 2003, 266(2): 442—447[DOI]
- 20 Tammela P, Laitinen L, Galkin A, et al. Permeability characteristics and membrane affinity of flavonoids and alkyl gallates in caco-2 cells and in phospholipid vesicles. *Arch Biochem Biophys*, 2004, 425(2): 193—199[DOI]
- 21 薛奇. 高分子结构研究中的光谱方法. 北京: 高等教育出版社, 1995
- 22 Hamai S, Kokubun H. Fluorescence depolarization study of hydrogen bonded 1-anthrol. *Bull Chem Soc Jpn*, 1974, 47(1): 24—27
- 23 Ollila F, Halling K, Vuorela P, et al. Characterization of flavonoid-biomembrane interactions. *Arch Biochem Biophys*, 2002, 399(1): 103—108[DOI]