

医药与日化原料

# 包载槲皮素 P/O/W 多重 Pickering 乳液的制备及表征

杨佳慧<sup>1,2</sup>, 梁蓉<sup>1,2\*</sup>, 杨成<sup>1,2</sup>

(1. 江南大学 合成与生物胶体教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 化学与材料工程学院, 江苏 无锡 214122)

**摘要:**以疏水 SiO<sub>2</sub> (AEROSIL®R202)、亲水 SiO<sub>2</sub> (AEROSIL®200) 为乳化剂, 一缩二丙二醇和甘油为内醇相, 制备了水包油包醇 (P/O/W) 多重 Pickering 乳液, 用其对槲皮素进行了包载。考察了内醇相质量分数、疏水 SiO<sub>2</sub> 质量分数、水乳比、亲水 SiO<sub>2</sub> 质量分数对 P/O/W 多重 Pickering 乳液性能的影响。采用激光扫描共聚焦显微镜 (CLSM)、XRD 对 P/O/W 多重乳液及包载槲皮素后的 P/O/W 多重乳液进行了表征。结果表明, P/O/W 多重 Pickering 乳液制备的最佳条件为: 内醇相 [m(甘油): m(一缩二丙二醇)=6:4] 质量分数为 20%、疏水 SiO<sub>2</sub> 质量分数为 3%、m(水相): m(P/O 初乳)=5:5、亲水 SiO<sub>2</sub> 质量分数为 2%。包载后槲皮素的结晶峰消失, 表明该多重乳液对槲皮素有良好的包载效果。离心法测得包载槲皮素 P/O/W 多重乳液的载药量达 0.45%±0.02%。体外透皮实验和猪皮 CLSM 显示, 槲皮素经该多重乳液包载后透皮性能得到改善, 这主要归因于槲皮素在内醇相中的溶解度可达(60.0±2.1) mg/g, 远高于其在水 (<0.5 μg/g) 或油 (<1 mg/g) 中的溶解度。

**关键词:** 槲皮素; P/O/W 多重 Pickering 乳液; 溶解度; 载药量; 透皮性能; 医药原料

**中图分类号:** TQ658; O648.2+3

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1003-5214 (2022) 07-1448-09

**开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID):**



## Preparation and characterization of quercetin-loaded P/O/W multiple Pickering emulsions

YANG Jiahui<sup>1,2</sup>, LIANG Rong<sup>1,2\*</sup>, YANG Cheng<sup>1,2</sup>

(1. Key Laboratory of Synthetic and Biological Colloids, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China; 2. School of Chemical and Material Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China)

**Abstract:** Polyol-in-oil-in-water (P/O/W) multiple Pickering emulsions were prepared to encapsulate quercetin using hydrophobic silica (AEROSIL®R202) and hydrophilic silica (AEROSIL®200) as emulsifiers, dipropylene glycol and glycerol as polyol phase. The effects of mass fractions of internal polyol phase, hydrophobic and hydrophilic silica as well as water to emulsion ratio on the encapsulation properties of P/O/W multiple Pickering emulsion for quercetin were investigated. Then the P/O/W double emulsion with/without quercetin loaded were characterized by confocal laser scanning microscope (CLSM) and XRD. The results showed that the optimum preparation conditions were obtained when mass fractions of internal alcohol phase [m(glycerol): m(dipropylene glycol)=6:4], hydrophobic silica and hydrophilic silica reached 20%, 3%, and 2% respectively while water to emulsion ratio m(aqueous phase): m(P/O primary emulsion) was kept at 5:5. The crystalline peak of quercetin, when encapsulated, could not be observed, indicating multiple P/O/W emulsion with excellent encapsulation capacity. The drug loading efficiency of the P/O/W emulsion for quercetin reached 0.45%±0.02% analyzed by HPLC after centrifugation. *In vitro* transdermal experiment and pig skin CLSM analysis indicated that encapsulation enhanced the transdermal performance of quercetin, which was mainly attributed to the fact that the solubility of quercetin in the internal polyol phase increased up to (60.0±2.1) mg/g, much high than that in water (<0.5 μg/g) or in oil (<1 mg/g).

收稿日期: 2021-12-30; 定用日期: 2022-04-01; DOI: 10.13550/j.jxhg.20211336

基金项目: 国家重点研发计划资助 (2016YFD0400801)

作者简介: 杨佳慧 (1997—), 女, 硕士生, E-mail: yjhzz0828@163.com。联系人: 梁蓉 (1983—), 女, 副教授, E-mail: rongliang@jiangnan.edu.cn。

**Key words:** quercetin; P/O/W double Pickering emulsion; solubility; drug loading efficiency; transdermal performance; drug materials

槲皮素又叫栲精, 是一类广泛存在于水果蔬菜中的黄酮类化合物, 具有抗氧化<sup>[1-2]</sup>、抗炎<sup>[3-4]</sup>、皮肤保护<sup>[5]</sup>等生物活性。然而, 槲皮素纯品为黄色针状结晶性粉末, 在油、水中溶解度均很低, 对光照及温度敏感, 在经皮应用上表现出较低的生物利用度, 限制了其在化妆品中的应用<sup>[6]</sup>。因此, 需要选择合适的微纳米载体以提高其生物利用度。目前, 用于包埋槲皮素的载体主要有 O/W 乳液<sup>[7]</sup>、纳米结构脂质体<sup>[8]</sup>、W/O/W 多重乳液<sup>[9]</sup>、脂质体<sup>[10]</sup>等。这些载体在一定程度上提高了槲皮素的生物利用度, 但仍有载量低、稳定性较差等缺陷。

多重乳液是将一种乳液分散在另外的连续相中形成的多层状乳液。由于其“三相两膜”的独特结构, 近年来在包埋、缓释以及保护活性物等方面引起广泛关注。ADITYA 等<sup>[11]</sup>将油溶性的姜黄素和水溶性的儿茶素同时负载在 W/O/W 多重乳液中, 使乳液具有多重功效。GALLARATE 等<sup>[12]</sup>比较了 O/W 微乳、O/W 与 W/O 乳液、W/O/W 多重乳液对 V<sub>C</sub> 的保护情况, 结果显示 W/O/W 多重乳液对 V<sub>C</sub> 的保护效果最好。

槲皮素在油、水中溶解度均很低, 但槲皮素富含酚羟基, 易与多元醇形成分子间氢键, 易溶于多元醇。本文用一缩二丙二醇和甘油代替传统 W/O/W 多重乳液的内水相制备 P/O/W 多重乳液, 将槲皮素溶解在一缩二丙二醇和甘油中, 首次采用 P/O/W 多重乳液包载槲皮素以提高槲皮素的溶解度及透皮性能。同时, 多重乳液界面能较高易破乳, 而胶体颗粒由于具有不可逆吸附稳定机制, 用其作乳化剂制备的乳液稳定性较传统表面活性剂制备的乳液要高<sup>[13]</sup>。因此, 使用亲水 SiO<sub>2</sub> AEROSIL®200、疏水 SiO<sub>2</sub>

AEROSIL®R202 代替传统表面活性剂, 制备 P/O/W 多重 Pickering 乳液, 以期得到高稳定性高负载量的槲皮素载体。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂及仪器

槲皮素 (质量分数 97%)、异硫氰酸荧光素 (FITC, 分析纯), 上海麦克林生化科技有限公司; 月见草油, 食品级, 江西中环新材料有限公司; 亲水 SiO<sub>2</sub> AEROSIL®200、疏水 SiO<sub>2</sub> AEROSIL®R202 (聚二甲基硅氧烷改性), 工业级, 赢创特种化学(上海)有限公司; 丙三醇, 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司; 一缩二丙二醇 (质量分数 99%)、尼罗红 (分析纯), 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 甲醇, 色谱级, 上海泰坦科技有限公司; OCT 冰冻切片包埋剂, 生物试剂级, 美国 Sakura 公司。

T18 高速分散机, 德国 IKA 公司; VXH-1000C 超景深三维显微镜, 基恩士(香港)有限公司; DHR-3 旋转流变仪, 美国 TA 公司; Leica TCC-SP-8 激光共聚焦显微镜 (CLSM)、CM1950 冰冻切片机, 德国 Leica 公司; OCA15EC 视频光学接触角测量仪, 德国 Data Physics 仪器股份有限公司; D8 X 射线衍射仪, 德国 Bruker AXS 有限公司; 1525u 高效液相色谱仪, 美国 Waters 公司; Centrifuge 5804R 离心机, 德国 Eppendorf 股份公司。

### 1.2 P/O/W 多重 Pickering 乳液的制备

如图 1 所示, 用两步法制备 P/O/W 多重 Pickering 乳液<sup>[14]</sup>。

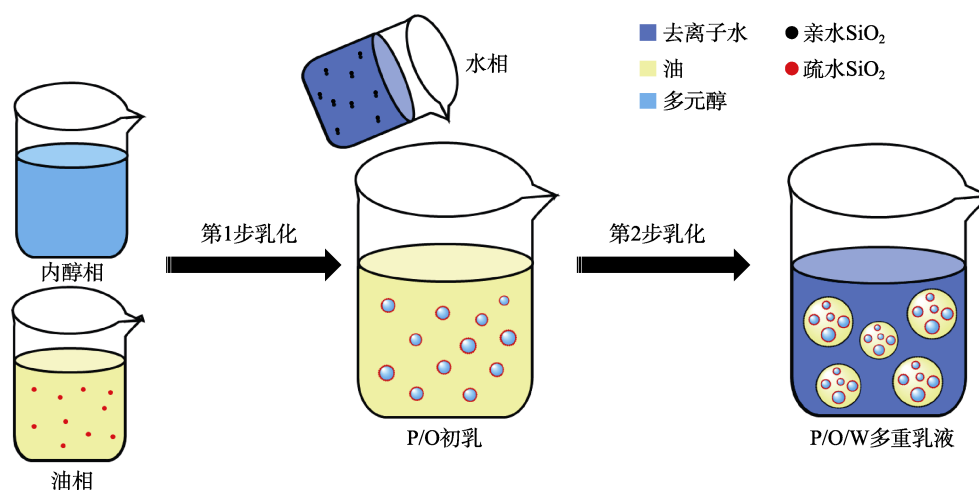


图 1 P/O/W 多重 Pickering 乳液的制备流程示意图

Fig. 1 Diagrammatic sketch of preparation process of P/O/W double Pickering emulsion

将一缩二丙二醇、甘油〔 $m(\text{甘油}) : m(\text{一缩二丙二醇})=6 : 4$ 〕用磁力搅拌混合均一, 制得内醇相, 将一定量疏水  $\text{SiO}_2$  加入到月见草油中, 使疏水  $\text{SiO}_2$  质量分数为 3%, 在 12000 r/min 下分散 1 min, 得到油相, 再将 2 g 内醇相加入到 8 g 油相中, 在 12000 r/min 下分散 2 min, 得到 P/O 初乳 (第 1 步乳化); 将一定量亲水  $\text{SiO}_2$  加入去离子水中, 使亲水  $\text{SiO}_2$  质量分数为 2%, 在 12000 r/min 下分散 1 min, 得到水相, 再将 5 g 水相加入到 5 g P/O 初乳中, 在 9000 r/min 下分散 2 min, 得到 P/O/W 多重 Pickering 乳液 (第 2 步乳化)。

### 1.3 P/O/W 多重 Pickering 乳液影响因素考察

以乳液微观结构和粒径为主要评价指标, 分别研究内醇相质量分数、疏水乳化剂质量分数、水乳比、亲水乳化剂质量分数对 P/O/W 多重 Pickering 乳液制备效果的影响。

### 1.4 包载槲皮素 P/O/W 多重 Pickering 乳液的制备

采用上述两步法制备包载槲皮素的 P/O/W 多重 Pickering 乳液。多元醇〔 $m(\text{甘油}) : m(\text{一缩二丙二醇})=6 : 4$ 〕中加入一定量的槲皮素, 使槲皮素质量分数为 6%, 搅拌混合至澄清透明, 制得内醇相, 月见草油中加入一定量疏水  $\text{SiO}_2$ , 使疏水  $\text{SiO}_2$  质量分数为 3%, 在 12000 r/min 下分散 1 min 得到油相, 再将 2 g 内醇相加入到 8 g 油相中, 在 12000 r/min 下分散 2 min 得到 P/O 初乳; 将一定量的亲水  $\text{SiO}_2$  加入到去离子水中, 使亲水  $\text{SiO}_2$  质量分数为 2%, 在 12000 r/min 下分散 1 min 得到水相, 再将 5 g 水相加入到 5 g P/O 初乳中, 在 9000 r/min 下分散 2 min, 得到包载槲皮素的 P/O/W 多重乳液。

### 1.5 测试与表征

#### 1.5.1 微观结构与粒径测定

用移液枪取 20  $\mu\text{L}$  乳液于载玻片上, 沿边缘缓慢放上盖玻片, 用超景深三维显微镜对其微观结构进行观察、拍摄。然后, 用 Nano Measurer 1.2 软件对照片中的乳液液滴直径进行测量统计, 体积平均粒径 ( $D_{43}$ ) 的计算公式为:

$$D_{43} = \frac{\sum d_i^4}{\sum d_i^3} \quad (1)$$

式中:  $d_i$  为乳液液滴的直径,  $\mu\text{m}$ <sup>[15]</sup>。

#### 1.5.2 乳液黏度测定

用旋转流变仪对乳液的流变性能进行表征。使用顶角角度 2° (直径 40 mm) 不锈钢锥板在剪切速率为 0.01~10  $\text{s}^{-1}$  下进行稳态剪切测试来获得乳液黏度。

#### 1.5.3 CLSM 观察乳液结构

用 CLSM 进一步观察多重乳液的各相分布<sup>[16-17]</sup>, P/O/W 多重乳液的水相和油相分别用水溶性荧光染料 FITC 和油溶性荧光染料尼罗红标记。分别在水相和油相中添加质量分数为 0.01% 的 FITC 和质量

分数为 0.01% 的尼罗红, 避光搅拌 30 min 使其充分染色, 按照 1.2 节中的方法制备 P/O/W 多重 Pickering 乳液, 整个制备过程需要避光以防止荧光染料荧光猝灭。将荧光标记后的多重乳液薄薄地铺展在玻底培养皿上, 在白光激光照射下, 使用以下两种荧光探测器采集图像: 采用 488 nm (激发 FITC) 和 552 nm (激发尼罗红) 的激发波长扫描样品, 单通道采集图像, 然后重叠通道获得叠加图。

#### 1.5.4 $\text{SiO}_2$ 三相接触角测定

使用座滴法测定两种  $\text{SiO}_2$  三相接触角<sup>[18]</sup>。取适量  $\text{SiO}_2$ , 用压片机制得厚度为 1~2 mm 的小圆片。将圆片置于盛有月见草油的透明玻璃皿中, 将装有多元醇〔 $m(\text{甘油}) : m(\text{一缩二丙二醇})=6 : 4$ 〕或去离子水的注射器针头插入到液面下, 控制注射器注射 4  $\mu\text{L}$  液滴于  $\text{SiO}_2$  圆片表面, 使用摄像机拍摄液滴图像后用椭圆拟合模型自动计算获得多元醇-月见草油- $\text{SiO}_2$  三相接触角 ( $\theta_{\text{OP}}$ ) 或去离子水-月见草油- $\text{SiO}_2$  三相接触角 ( $\theta_{\text{OW}}$ )。

#### 1.5.5 XRD 分析

分别取槲皮素、空白多重乳液、包载槲皮素多重乳液适量进行 XRD 分析。分析条件: 铜靶  $K_{\alpha}$  射线源, 电流为 40 mA, 电压强度为 40 kV, 扫描角度 ( $2\theta$ ) 为 5°~50°, 扫描速率为 5(°)/min<sup>[19]</sup>。

#### 1.5.6 包载槲皮素的多重 Pickering 乳液载药量测定

采用离心法<sup>[9]</sup>测定该多重乳液的载药量。具体如下: 准确吸取 1 mL 负载槲皮素的多重乳液于离心管中, 测定负载槲皮素多重乳液的总质量, 记为  $W_1$  (g)。乳液中游离的槲皮素通过离心 (10000 r/min 离心 15 min) 从多重乳液中分离出来, 将沉积在底部的槲皮素使用高效液相色谱 (HPLC) 进样分析, 得到多重乳液中游离槲皮素的质量, 质量记为  $W_2$  (g)。另准确吸取 1 mL 负载槲皮素的多重乳液于容量瓶中, 加入等量的二甲基亚砷作为破乳剂, 混合超声 10 min 直至乳液完全破乳, 将破乳后的乳液稀释一定倍数后使用 HPLC 分析, 得到多重乳液中槲皮素的总质量, 记为  $W_3$  (g)。根据式 (2、3) 计算载药量和包封率:

$$\text{载药量}/\% = (W_3 - W_2) / W_1 \times 100 \quad (2)$$

$$\text{包封率}/\% = (W_3 - W_2) / W_3 \times 100 \quad (3)$$

#### 1.5.7 包载槲皮素的多重 Pickering 乳液体外透皮实验

选取厚度相当、无损伤的猪皮进行透皮实验<sup>[20]</sup>。首先, 用手术刀将猪皮的皮下油脂去除至毛孔清晰, 用镊子将猪皮表面残留的毛拔除干净, 然后将猪皮剪成约 2.5 cm×2.5 cm 的大小后固定于 Franz 扩散池的接收池与供给池之间, 真皮层朝向接收池放置; 接收池中加满 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液 (PBS); 在供

给池中分别加入 2 mL 包载槲皮素的多重乳液以及槲皮素水分散液(槲皮素质量分数为 0.60%); 将组装好的 Franz 扩散池放入透皮扩散仪中, 实验条件设置为: 温度 37 °C; 搅拌速度 400 r/min; 透皮时间 12 h。12 h 后, 从扩散池中取出猪皮, 用脱脂棉擦去猪皮表面残留的样品, 使用 Tape stripping 法<sup>[21]</sup>测猪皮角质层中槲皮素的含量: 用 3M 胶带粘下猪皮表面 21 层皮肤, 舍弃第一层, 将剩余 20 层置于 15 mL 离心管中, 加入 2 mL 甲醇, 超声 30 min, 于 5000 r/min 离心 30 min, 取上清液用 0.22 μm 有机滤膜过滤后, 采用 HPLC 测槲皮素的含量, 即为角质层中槲皮素的含量。

剩余皮肤剪碎后置于 15 mL 离心管中, 加入 2 mL 甲醇, 超声 30 min, 然后于 5000 r/min 下离心 30 min, 取上清液用 0.22 μm 有机滤膜过滤后采用高效液相色谱法测定槲皮素的含量, 即为活力表皮和真皮层中槲皮素的含量。

#### 1.5.8 HPLC 法测定槲皮素含量

进样条件为: C18 柱, 150 mm×4.6 mm×3.5 μm; 流动相 V(甲醇): V(磷酸水溶液, 磷酸质量分数为 0.05%)=1:1, 流速 1.0 mL/min, 检测波长为 373 nm, 进样量为 8 μL, 柱温为 25 °C。测得的标准曲线回归方程为  $y = 0.7542x + 0.4713$ ,  $R^2 = 0.9991$ , 其中  $x$  为槲皮素浓度,  $y$  为不同浓度槲皮素对应的峰面积。

#### 1.5.9 CLSM 观察猪皮截面

槲皮素在一定激发波长下能够激发出绿色荧光, 因此, 使用 CLSM 进一步观察槲皮素在猪皮中的透皮情况。如 1.5.7 节所述透皮结束后, 剪下适宜宽度的猪皮, 用冰冻切片包埋剂将其包裹, 冷冻后用冷冻切片机将其切成 20 μm 的薄片, 采用 488 nm 的激发波长观察其截面。

#### 1.6 数据处理

采用 Origin 和 SPSS 等软件进行数据分析, 所有数值用均数±标准差 (Mean±SD) 表示, 除已说明外, 其他所有实验均平行操作 3 次。

## 2 结果与讨论

### 2.1 内醇相质量分数对 P/O 初乳微观结构与粒径的影响

稳定的初乳是制备出稳定多重乳液的前提。初乳粒径越小, 在制备过程中越不易被破坏, 最终制备的多重乳液包封率越高<sup>[22]</sup>, 因此先考察了各因素对初乳的影响, 其他反应条件同 1.2 节。

首先考察了内醇相 [  $m(\text{甘油}) : m(\text{一缩二丙二醇}) = 6 : 4$  ] 质量分数对 P/O 初乳的影响。图 2 展示了不同内醇相质量分数 P/O 初乳的显微镜图及粒

径。从图 2 可以看出, 内醇相质量分数为 50% 的 P/O 初乳粒径较大且粒径分布广, 乳液液滴易破裂, 这是由于内醇相过多油相无法将内醇相均匀分散。内醇相质量分数为 40%~10% 的 P/O 初乳粒径较均一。随着内醇相比比例减小, 初乳粒径减小。出现这种趋势的原因是, 随着内醇相质量分数减小, 外油相增加, 吸附在两相界面上的胶体颗粒数量增加, 促使形成更细小的液滴<sup>[23]</sup>。当内醇相质量分数减小至 20% 时, 粒径减小趋势变缓, 而内醇相太少不利于活性物的包载。因此, 选择质量分数为 20% 的内醇相进行后续实验。

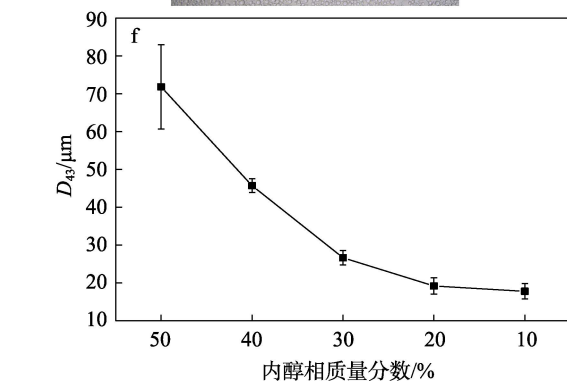
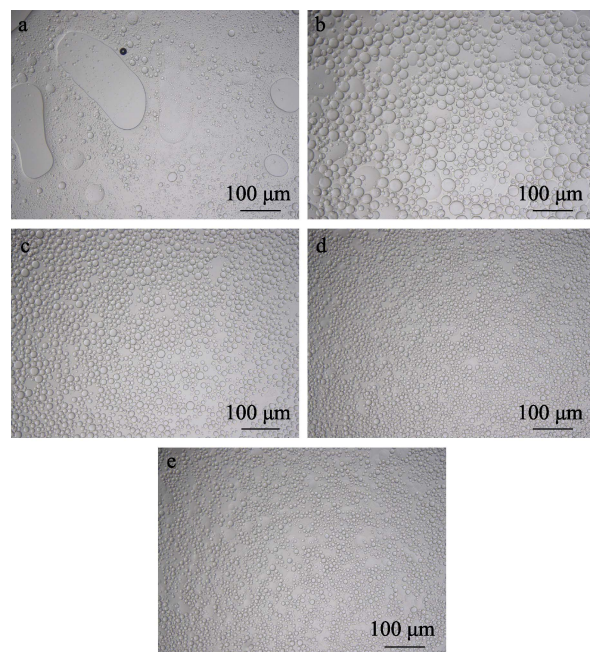
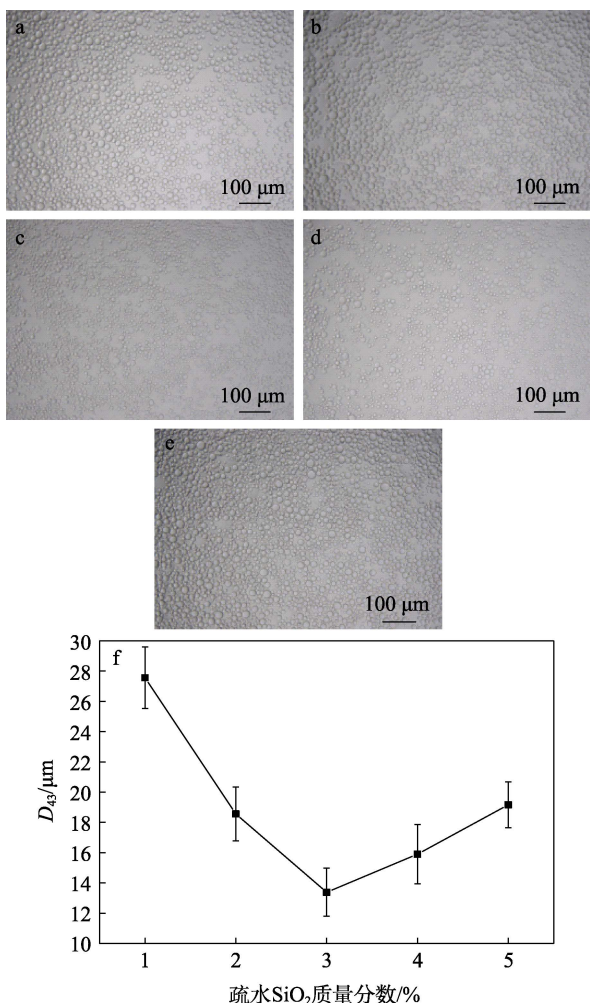


图 2 不同内醇相质量分数 P/O 初乳的显微镜图及粒径  
Fig. 2 Microscopic images and particle size of P/O primary emulsions with different mass fractions of internal polyol phase

### 2.2 疏水 SiO<sub>2</sub> 质量分数对 P/O 初乳微观结构与粒径的影响

保持内醇相 [  $m(\text{甘油}) : m(\text{一缩二丙二醇}) = 6 : 4$  ] 质量分数为 20%, 考察了不同疏水 SiO<sub>2</sub> 质量分数对 P/O 初乳的影响, 其他反应条件同 1.2 节。图 3

展示了不同疏水 SiO<sub>2</sub> 质量分数 P/O 初乳的显微镜图及粒径。



a—1%; b—2%; c—3%; d—4%; e—5%  
 图 3 不同疏水 SiO<sub>2</sub> 质量分数 P/O 初乳的显微镜图及粒径  
 Fig. 3 Microscopic images and particle size of P/O primary emulsions with different mass fractions of hydrophobic SiO<sub>2</sub>

由图 3 可知，随着疏水 SiO<sub>2</sub> 质量分数的增加，制得的乳液粒径先减小后增大。这是因为当疏水 SiO<sub>2</sub> 质量分数较低时，乳液中分散的疏水性颗粒较少，不足以将内醇相完全包裹，因此制得的乳液不稳定，乳液粒径较大。随着疏水颗粒浓度的增加，吸附在两相界面上的疏水颗粒数量增加，体现为乳液粒径减小<sup>[24]</sup>。而当疏水 SiO<sub>2</sub> 质量分数更高时，过

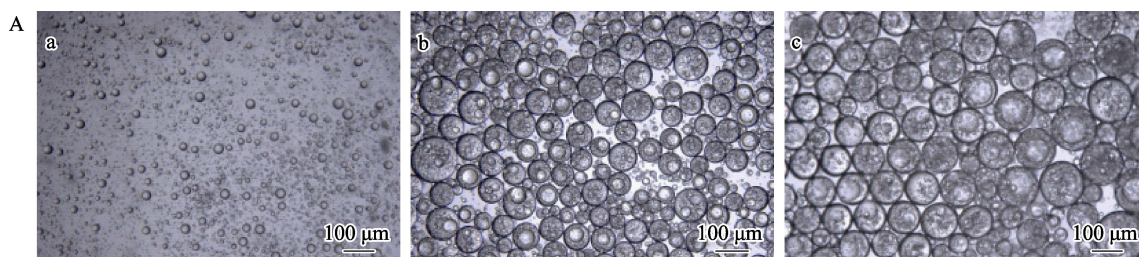
多的疏水 SiO<sub>2</sub> 颗粒会趋向于聚集在油相中，进而影响乳液稳定性导致乳液粒径变大。所以，选择质量分数为 3% 的疏水 SiO<sub>2</sub> 用于 P/O 初乳制备。

### 2.3 水乳比对 P/O/W 多重乳液微观结构与粒径的影响

在制备出粒径较小稳定性高的 P/O 初乳后，进一步考察了各因素对多重乳液的影响。首先考察了水相与 P/O 初乳质量比（简称水乳比）对多重乳液的影响。图 4A 为不同水乳比多重乳液的显微镜图及外观图，图 4B 为水乳比为 5 : 5~8 : 2 多重乳液的粒径图。从图 4A 可以看出，水乳质量比过低（4 : 6）无法形成多重乳液，这可能是由于连续相过少，无法将分散相分散。当水乳质量比大于 4 : 6 时，形成的乳液大液滴中包含数个个小液滴，呈现明显的多重结构。但是随着水乳质量比的增加，多重乳液的粒径增加（图 4B），乳析现象也随之增强。乳液黏度是影响乳析的重要因素，高黏度会限制乳液液滴间的运动从而减小乳析<sup>[25]</sup>。因此，测量了水乳质量比为 5 : 5~8 : 2 多重乳液的剪切黏度。从图 4C 可以看出，随着水乳质量比增加，乳液黏度减小，这是导致乳析现象增强的主要原因。并且由于乳液黏度减小，乳液在制备过程中所受到的剪切应力减小，导致粒径增大，稳定性减弱。类似的趋势也在其他文献中有所报道<sup>[26-27]</sup>。所以，最终选择水乳质量比 5 : 5 制备 P/O/W 多重乳液。

### 2.4 亲水 SiO<sub>2</sub> 质量分数对 P/O/W 多重乳液微观结构与粒径的影响

保持水乳质量比 5 : 5 不变，考察了亲水 SiO<sub>2</sub> 质量分数对多重乳液的影响，其他反应条件同 1.2 节。图 5 为不同亲水 SiO<sub>2</sub> 质量分数多重乳液的显微镜图和粒径。从图 5 可以看出，随着亲水 SiO<sub>2</sub> 质量分数的增加，多重乳液粒径减小，但同时大液滴中内醇相液滴也明显减少。这是由于过多的亲水乳化剂会导致油醇界面的破裂<sup>[28]</sup>。当亲水 SiO<sub>2</sub> 质量分数增加至 3% 时，多重乳液大液滴中包含的内醇相液滴明显变稀疏。粒径较小的乳液具有更好的储存稳定性，但多重乳液内醇相液滴的减少不利于活性物的包载。因此，权衡两者最终选择质量分数为 2% 的亲水 SiO<sub>2</sub> 用于多重乳液的制备。



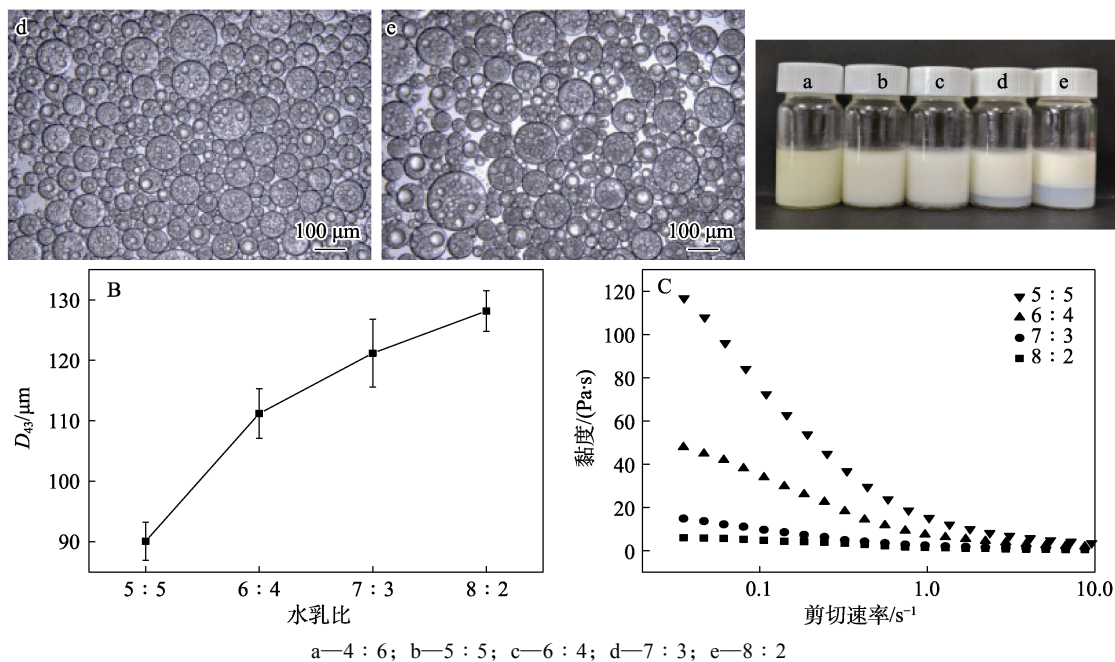


图 4 不同水乳比多重乳液显微镜图及外观 (A)、粒径 (B) 和剪切速率-黏度曲线 (C)  
 Fig. 4 Microscopic images, appearance (A), particle size (B) and shear rate-viscosity curves (C) of P/O/W double emulsions with different ratios of water to primary emulsion

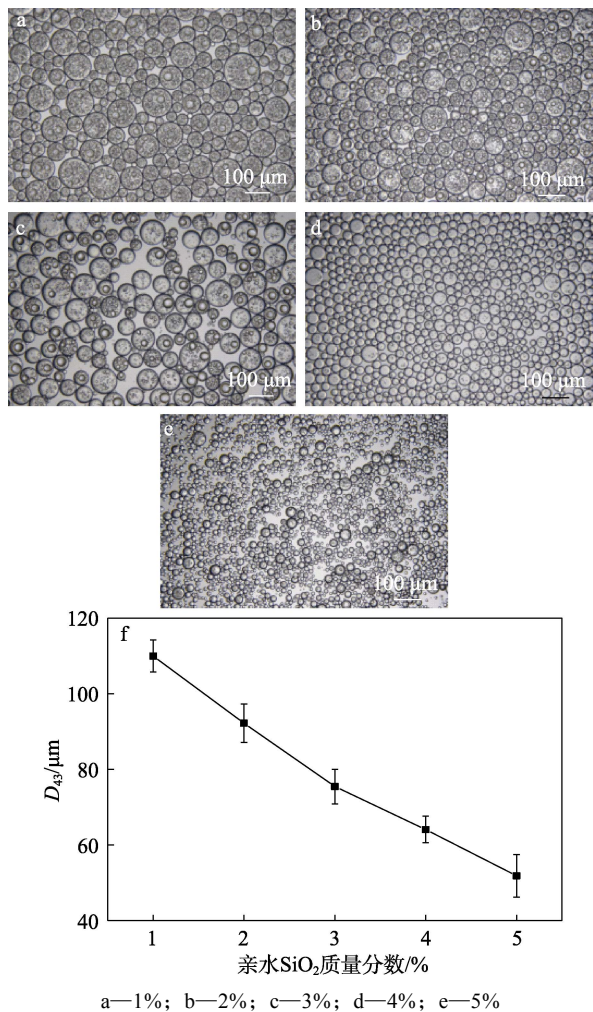
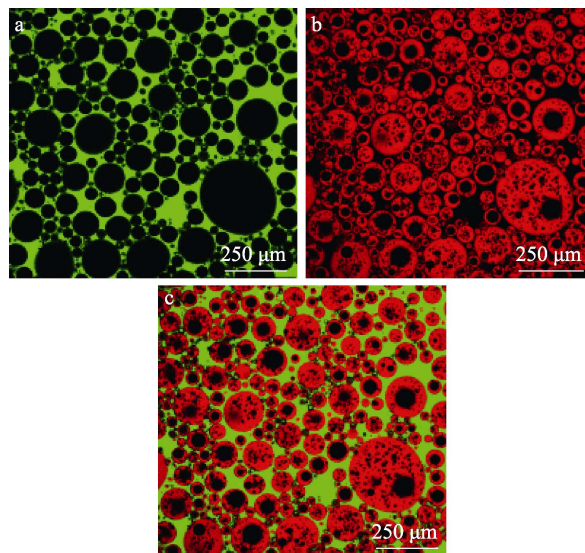


图 5 不同亲水 SiO<sub>2</sub> 质量分数多重乳液显微镜图及粒径  
 Fig. 5 Microscopic images and particle size of P/O/W double emulsions with different mass fractions of hydrophilic SiO<sub>2</sub>

### 2.5 CLSM 表征 P/O/W 多重乳液结构

对多重乳液各相分别染色, 然后用 CLSM 更直观地观察了乳液的各相分布。图 6a 为激光共聚焦 488 nm 激发 (激发 FITC) 下的图像, 图 6b 为激光共聚焦 552 nm 激发 (激发尼罗红) 下的图像, 图 6c 为两通道叠加图。



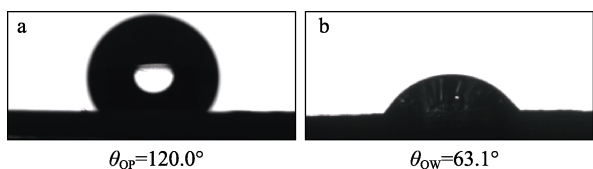
a—FITC 标记水相; b—尼罗红标记油相; c—两通道叠加图  
 图 6 P/O/W 多重乳液 CLSM 图  
 Fig. 6 CLSM images of the P/O/W double emulsions

由图 6 可知, FITC 染色的水相在 488 nm 激发下呈绿色, 尼罗红染色的油相在 552 nm 激发下呈红色, 而未染色的醇相呈黑色。由图 6c 可以看出, 水相 (绿色) 中分散着数个油滴 (红色), 油滴中还分

散着数个内醇相小液滴(黑色),显示形成了明显的P/O/W多重乳液结构,并且内醇相液滴密集,有利于活性物的包载。

### 2.6 SiO<sub>2</sub>三相接触角分析

从上述结果看出,使用两种SiO<sub>2</sub>成功制备了P/O/W多重Pickering乳液,进一步探讨了两种SiO<sub>2</sub>在该多重乳液中的稳定机制。Pickering颗粒因为能同时被两相润湿使其能附着在两相界面上,且Pickering颗粒润湿性对Pickering乳液类型有强烈影响,润湿性更好的相趋向于形成连续相<sup>[29]</sup>。而多重Pickering乳液中两种类型乳液共存,往往需要两种润湿性不同的颗粒分别稳定<sup>[30-31]</sup>。颗粒润湿性可以用三相接触角来表征,因此测定了两种SiO<sub>2</sub>的三相接触角,结果见图7。



a—疏水 SiO<sub>2</sub> AEROSIL®R202 三相接触角  $\theta_{OP}$ ; b—亲水 SiO<sub>2</sub> AEROSIL®200 三相接触角  $\theta_{OW}$

图 7 两种 SiO<sub>2</sub> 三相接触角

Fig. 7 Three-phase contact angles of two SiO<sub>2</sub>

由图7可知,疏水SiO<sub>2</sub> AEROSIL®R202三相接触角 $\theta_{OP}$ 为 $120.0^\circ \pm 3.8^\circ$ ,由于经聚二甲硅氧烷改性,未经改性的二氧化硅表面的羟基被部分取代,颗粒润湿性更趋向于油相,形成P/O乳液。亲水SiO<sub>2</sub> AEROSIL®200三相接触角 $\theta_{OW}$ 为 $63.1^\circ \pm 3.1^\circ$ ,由于表面存在较多硅羟基,所以接触角小于 $90^\circ$ ,颗粒润湿性更少趋向于油相,形成O/W乳液。因此,在该多重乳液中,疏水SiO<sub>2</sub>和亲水SiO<sub>2</sub>分别稳定油醇界面与水油界面,形成稳定的P/O/W多重结构。

### 2.7 P/O/W多重乳液对槲皮素的包载

将优化后的P/O/W多重Pickering乳液用于槲皮素包载。图8A为包载槲皮素的P/O/W多重乳液的外观及显微镜图像。由图8A可知,乳液外观均一,微观结构显示乳液表现为明显的多重结构,证明槲皮素的添加不会影响多重结构的形成。

为进一步研究槲皮素在乳液中的状态,采用X射线衍射对槲皮素纯品、空白多重乳液、负载槲皮素的多重乳液进行了分析,结果见图8B。由图8B可知,槲皮素在 $2\theta=5^\circ \sim 30^\circ$ 存在较多结晶峰,表明槲皮素处于高结晶态。空白多重乳液和负载槲皮素的多重乳液XRD图谱基本一致,同时负载槲皮素的多重乳液中槲皮素的结晶特征峰消失,说明槲皮素主要溶解在多重乳液的内醇相(一缩二丙二醇和甘油)中,该多重乳液对槲皮素有良好的包载效果。

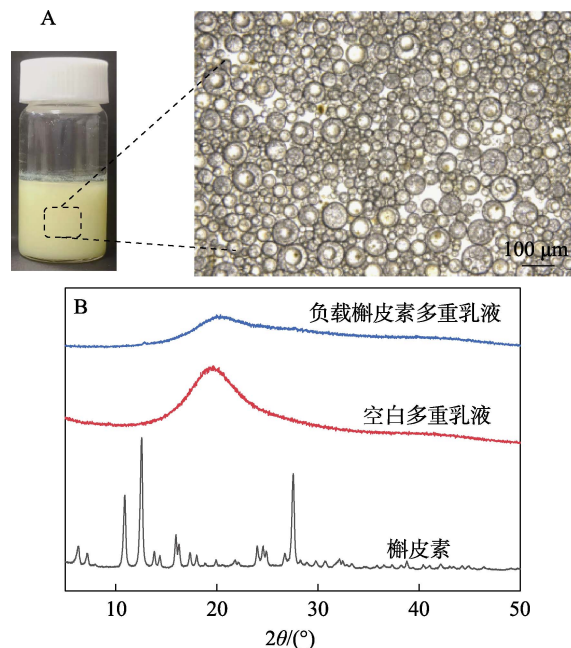


图 8 包载槲皮素多重乳液的外观及显微镜图(A);槲皮素、空白多重乳液以及负载槲皮素多重乳液的XRD谱图(B)

Fig. 8 Appearance and microscope image of quercetin-loaded double emulsion (A); XRD patterns of quercetin, blank double emulsion and quercetin-loaded double emulsion (B)

采用离心法对乳液中槲皮素的载药量进行测定,测得整个乳液体系中的载药量为 $0.45\% \pm 0.02\%$ ,相较于其他包载槲皮素乳液的载药量有所提高,如O/W乳液载药量为 $0.004\%$ <sup>[7]</sup>、纳米结构脂质体载药量为 $0.192\%$ <sup>[8]</sup>、W/O/W多重乳液载药量为 $0.054\%$ <sup>[9]</sup>、脂质体载药量为 $0.114\%$ <sup>[10]</sup>。这主要是由于槲皮素在P/O/W多重乳液多元醇[ $m(\text{甘油}) : m(\text{一缩二丙二醇}) = 6 : 4$ ]中的溶解度[( $60.0 \pm 2.1$ ) mg/g]远大于在水( $< 0.5 \mu\text{g/g}$ )或油( $< 1 \text{mg/g}$ )中的溶解度。

### 2.8 包载槲皮素多重乳液的体外经皮渗透研究

图9为槲皮素多重乳液和槲皮素水分散液经12h处理后的透皮情况。由图9A可知,槲皮素多重乳液中槲皮素在角质层中的含量为 $1.96\% \pm 0.45\%$ ,高于槲皮素水分散液的 $1.39\% \pm 0.45\%$ ;槲皮素多重乳液中槲皮素在活力表皮+真皮层中的含量为 $16.38\% \pm 1.44\%$ ,也显著高于槲皮素水分散液的 $3.66\% \pm 1.29\%$  ( $p < 0.05$ )。

为了更直观地了解槲皮素在皮肤中的分布,采用CLSM对透皮后的猪皮进行了表征,结果如图9B所示。槲皮素多重乳液中槲皮素的透皮深度和强度均大于槲皮素水分散液,这与测得的槲皮素在皮肤各层中的含量一致。

以上结果表明,P/O/W多重乳液对槲皮素进行包载后可显著提高槲皮素的透皮能力。这主要是由于P/O/W多重乳液可明显提高槲皮素的水溶性,

此外体系组成中含有的内醇相(甘油以及一缩二丙二醇)以及不饱和脂肪酸(月见草油)等也可以增强角质层脂质流动性,进而促进槲皮素的经皮输送<sup>[32]</sup>。总之,与槲皮素水分散液相比,P/O/W 多重乳液对槲皮素包载后可显著提高槲皮素的溶解度和透皮性能,具有一定的皮肤靶向作用。

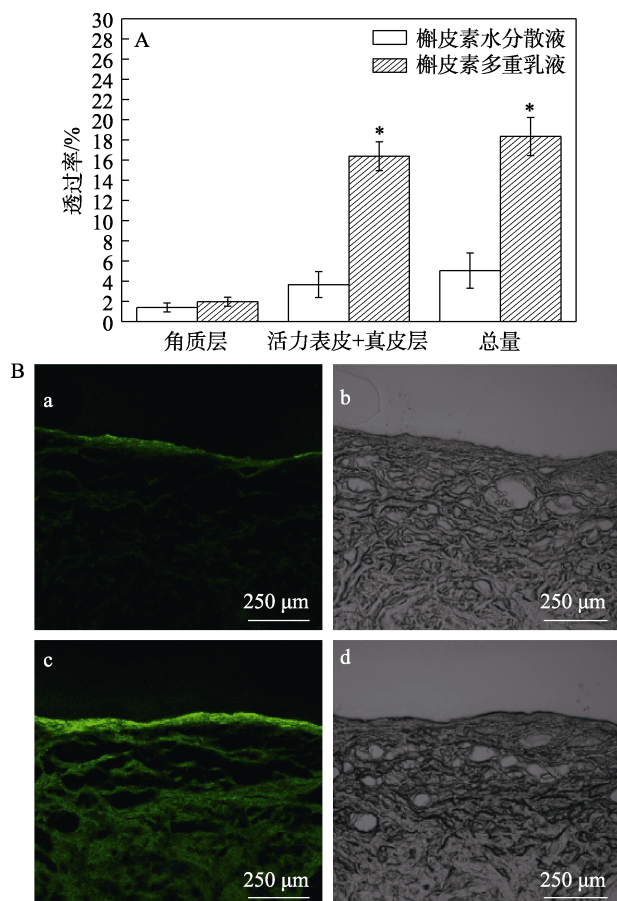


图 9 槲皮素水分散液和槲皮素多重乳液透皮 12 h 后在角质层、活力表皮+真皮层中的槲皮素含量 (A); 透皮处理后的猪皮截面显微镜图 (B: a—槲皮素水分散液处理猪皮荧光通道; b—槲皮素水分散液处理猪皮自然光通道; c—槲皮素多重乳液处理猪皮荧光通道; d—槲皮素多重乳液处理猪皮自然光通道)

Fig. 9 Quercetin content in stratum corneum, active epidermi+dermis after treatment with quercetin aqueous dispersion and quercetin-loaded double emulsion (A); Microscope images of cross-section of pig skin after transdermal treatment (B: a—fluorescence channel of pig skin treated with quercetin aqueous dispersion; b—natural light channel of pig skin treated with quercetin aqueous dispersion; c—fluorescence channel of pig skin treated with quercetin-loaded double emulsion; d—natural light channel of skin treated with quercetin-loaded double emulsion)

### 3 结论

(1) 考察了各因素对 P/O/W 多重 Pickering 乳

液制备的影响,得到 P/O/W 多重 Pickering 乳液最佳制备条件为:内醇相 [m(甘油):m(一缩二丙二醇)=6:4] 质量分数为 20%、疏水 SiO<sub>2</sub> 质量分数为 3%、m(水相):m(P/O 初乳)=5:5、亲水 SiO<sub>2</sub> 质量分数为 2%。

(2) 采用 P/O/W 多重 Pickering 乳液对油水两难溶性活性物槲皮素进行包载,有效提高了槲皮素的溶解度及透皮性能。

(3) 在之后的研究中可将该体系用于其他油水两难溶性活性物的包载,考察该体系的普适性。

### 参考文献:

- [1] BOOTS A W, HAENEN G R, BAST A. Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2008, 585(2/3): 325-337.
- [2] COSKUN O, KANTER M, KORKMAZ A, *et al.* Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and  $\beta$ -cell damage in rat pancreas[J]. *Pharmacological Research*, 2005, 51(2): 117-123.
- [3] ROGERIO A P, KANASHIRO A, FONTANARI C, *et al.* Anti-inflammatory activity of quercetin and isoquercitrin in experimental murine allergic asthma[J]. *Inflammation Research*, 2007, 56(10): 402-408.
- [4] COMALADA M, CAMUESCO D, SIERRA S, *et al.* *In vivo* quercitrin anti-inflammatory effect involves release of quercetin, which inhibits inflammation through down-regulation of the NF- $\kappa$ B pathway[J]. *European Journal of Immunology*, 2005, 35(2): 584-592.
- [5] TAKEKOSHI S, MATSUZAKI K, KITATANI K. Quercetin stimulates melanogenesis in hair follicle melanocyte of the mouse[J]. *Tokai Journal of Experimental & Clinical Medicine*, 2013, 38(4): 129-134.
- [6] KITAGAWA S, TANAKA Y, TANAKA M, *et al.* Enhanced skin delivery of quercetin by microemulsion[J]. *Journal of Pharmacy & Pharmacology*, 2010, 61(7): 855-860.
- [7] KHALID N, KOBAYASHI I, NEVES M A, *et al.* Microchannel emulsification study on formulation and stability characterization of monodisperse oil-in-water emulsions encapsulating quercetin[J]. *Food Chemistry*, 2016, 212: 27-34.
- [8] LIU L, TANG Y H, GAO C, *et al.* Characterization and biodistribution *in vivo* of quercetin-loaded cationic nanostructured lipid carriers[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2014, 115: 125-131.
- [9] CHEN X, MCCLEMENTS D J, WANG J, *et al.* Coencapsulation of (-)-epigallocatechin-3-gallate and quercetin in particle-stabilized W/O/W emulsion gels: Controlled release and bioaccessibility[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(14): 3691-3699.
- [10] CARLA C, OCTAVIO D, RAMON P, *et al.* Cross-linked chitosan/liposome hybrid system for the intestinal delivery of quercetin[J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2016, 461: 69-78.
- [11] ADITYA N P, ADITYA S, YANG H, *et al.* Co-delivery of hydrophobic curcumin and hydrophilic catechin by a water-in-oil-in-water double emulsion[J]. *Food Chemistry*, 2015, 173: 7-13.
- [12] GALLARATE M, CARLOTTI M E, TROTTA M, *et al.* On the stability of ascorbic acid in emulsified systems for topical and cosmetic use[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 1999, 188(2): 233-241.
- [13] BINKS B P. Particles as surfactants—Similarities and differences[J]. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2002, 7(1/2): 21-41.
- [14] LAMBA H, SATHISH K, SABIKHI L. Double emulsions: Emerging delivery system for plant bioactives[J]. *Food and Bioprocess Technology*, 2015, 8(4): 709-728.
- [15] WANG J, SUN Y J, YU M Y, *et al.* Emulsions stabilized by highly hydrophilic TiO<sub>2</sub> nanoparticles *via* Van der Waals attraction[J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2021, 589: 378-387.
- [16] SCHUSTER S, BERNEWITZ R, GUTHAUSEN G, *et al.* Analysis of



- W1/O/W2 double emulsions with CLSM: Statistical image processing for droplet size distribution[J]. *Chemical Engineering Science*, 2012, 81: 84-90.
- [17] SUN Y J, FAN S Y, LIANG R, *et al.* Design and characterization of starch/solid lipids hybrid microcapsules and their thermal stability with menthol[J]. *Food Hydrocolloids*, 2021, 116(2):106631.
- [18] ZOU Y, GUO J, YIN S W, *et al.* Pickering emulsion gels prepared by hydrogen-bonded zein/tannic acid complex colloidal particles[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015, 63(33): 7405-7414.
- [19] SUN C X, DAI L, GAO Y X. The binary complex based on zein and propylene glycol alginate for delivery of quercetagenin[J]. *Biomacromolecules*, 2016, 17(12): 3973-3985.
- [20] XIE G J (谢桂杰), LIANG R (梁蓉), YANG C (杨成). Effects of solid lipids on the transdermal delivery of coenzyme Q10 nanosolve[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2020, 37(6): 1242-1248.
- [21] KLANG V, SCHWARZ J C, LENOBEL B, *et al.* *In vitro vs. in vivo* tape stripping: Validation of the porcine ear model and penetration assessment of novel sucrose stearate emulsions[J]. *European Journal of Pharmaceutics & Biopharmaceutics*, 2012, 80(3): 604-614.
- [22] NING Y, WANG C Y, NGAI T, *et al.* Fabrication of tunable janus microspheres with dual anisotropy of porosity and magnetism[J]. *Langmuir*, 2013, 29(17): 5138-5144.
- [23] XIAO J, WANG X A, GONZALEZ A, *et al.* Kafirin nanoparticles-stabilized Pickering emulsions: Microstructure and rheological behavior[J]. *Food Hydrocolloids*, 2016, 54: 30-39.
- [24] NAN F F, WU J, QI F, *et al.* Uniform chitosan-coated alginate particles as emulsifiers for preparation of stable Pickering emulsions with stimulus dependence[J]. *Colloids & Surfaces A: Physicochemical & Engineering Aspects*, 2014, 456: 246-252.
- [25] DICKINSON E, GOLDING M, POVEY M. Creaming and flocculation of oil-in-water emulsions containing sodium caseinate[J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 1997, 185(2): 515-529.
- [26] MATOS M, GUTIÉRREZ G, MARTINEZ-REY L, *et al.* Encapsulation of resveratrol using food-grade concentrated double emulsions: Emulsion characterization and rheological behaviour[J]. *Journal of Food Engineering*, 2018, 226: 73-81.
- [27] DIAZ-RUIZ R, MARTINEZ-REY L, LACA A, *et al.* Enhancing trans-Resveratrol loading capacity by forcing W1/O/W2 emulsions up to its colloidal stability limit[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2020, 193:111130.
- [28] WANG X N, JIANG S F, WANG X Y, *et al.* Preparation and evaluation of nattokinase-loaded self-double-emulsifying drug delivery system[J]. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2015, 10(5): 386-395.
- [29] XIAO J, LI Y Q, HUANG Q R. Recent advances on food-grade particles stabilized Pickering emulsions: Fabrication, characterization and research trends[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2016, 55: 48-60.
- [30] AVEYARD R, BINKS B P, CLINT J H. Emulsions stabilised solely by colloidal particles[J]. *Advances in Colloid & Interface Science*, 2003, 100/101/102: 503-546.
- [31] MAEDA H, OKADA M, FUJII S, *et al.* Pickering-type water-in-oil-in-water multiple emulsions toward multihollow nanocomposite microspheres[J]. *Langmuir*, 2010, 26(17): 13727-13731.
- [32] KANIKKANNAN N, KANDIMALLA K, LAMBA S S, *et al.* Structure-activity relationship of chemical penetration enhancers in transdermal drug delivery[J]. *Current Medicinal Chemistry*, 2000, 7(6): 593-608.

(上接第 1375 页)

- [26] WANG Y Y (王云英). Studies on the preparations and damping performances of polyurethane hollow fiber damping materials[D]. Nanchang: Nanchang Hangkong University (南昌航空大学), 2010.
- [27] LURIE S, MINHAT M, TUCHKOVA N, *et al.* On remarkable loss amplification mechanism in fiber reinforced laminated composite materials[J]. *Applied Composite Materials*, 2014, 21(1): 179-196.
- [28] CHEN S B, WANG Q H, WANG T M. Physical properties of aramid fiber reinforced castor oil-based polyurethane/epoxy resin IPN composites[J]. *Journal of Reinforced Plastics and Composites*, 2013, 32(15): 1136-1142.
- [29] WANG T M, CHEN S B, WANG Q H, *et al.* Damping analysis of polyurethane/epoxy graft interpenetrating polymer network composites filled with short carbon fiber and micro hollow glass bead[J]. *Materials & Design*, 2010, 31(8): 3810-3815.
- [30] RYBINSKI P, SYREK B, MARZEC A, *et al.* Effects of basalt and carbon fillers on fire hazard, thermal, and mechanical properties of EPDM rubber composites[J]. *Materials*, 2021, 14(18): 5245.
- [31] LU G J, WANG W H, SHEN S J. Mechanical properties of wood flour reinforced high density polyethylene composites with basalt fibers[J]. *Materials Science*, 2014, 20(4): 464-467.
- [32] ARSLAN C, DOGAN M. Effect of fiber amount on mechanical and thermal properties of (3-aminopropyl)triethoxysilane treated basalt fiber reinforced ABS composites[J]. *Materials Research Express*, 2019, 6(11): 115340.
- [33] SUN J (孙捷), ZHENG Y S (郑元锁), GAO G X (高国新). Mechanical properties of a modified hydroxyl-terminated polybutadiene based polyurethane[J]. *Chinese Journal of Energetic Materials (含能材料)*, 2008, 16(3): 323-326.

(上接第 1425 页)

- [16] JIANG A N, WANG Z G, LI Q, *et al.* Ionic liquid assisted-synthesis of hierarchical one-dimensional MoP/NPC for high performance supercapacitor and electrocatalysis[J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2020, 8: 6343-6351.
- [17] KUMAR N, SUN Y, NICKLAS M, *et al.* Extremely high conductivity observed in the triple point topological metal MoP[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 2475-2481.
- [18] ZHANG X Y, WU Z Z, WANG D Z. Oxygen-incorporated defect-rich MoP for highly efficient hydrogen production in both acidic and alkaline media[J]. *Electrochim Acta*, 2018, 281: 540-548.
- [19] LI S J, WANG R H, YANG X, *et al.* Binary metal phosphides with MoP and FeP embedded in P,N-doped graphitic carbon as electrocatalysts for oxygen reduction[J]. *ACS Sustainable Chem Eng*, 2019, 7: 11872-11884.
- [20] FU W Q, ZHAO W B, ZHANG L, *et al.* ZSM-5 microspheres consisted of nanocrystals for preparing highly dispersed MoP clusters with good activity in phenanthrene hydrogenation[J]. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2019, 58(37): 17289-17299.
- [21] MCENANEY J M, CROMPTON J C, CALLEJAS J F, *et al.* Amorphous molybdenum phosphide nanoparticles for electrocatalytic hydrogen evolution[J]. *Chemistry of Materials*, 2014, 26(16): 4826-4831.
- [22] ZHANG L, FU W Q, YU Q Y, *et al.* Effect of citric acid addition on the morphology and activity of Ni<sub>2</sub>P supported on mesoporous zeolite ZSM-5 for the hydrogenation of 4,6-DMDBT and phenanthrene[J]. *Journal of Catalysis*, 2017, 345: 295-307.
- [23] OYAMA S T, WANG X, LEE Y K, *et al.* Effect of phosphorus content in nickel phosphide catalysts studied by XAFS and other techniques[J]. *Journal of Catalysis*, 2002, 210(1): 207-217.