文章编号:1673-1689(2008)06-0023-06

第二步乳化工艺参数对W/O/W型复乳稳定性和胰岛素包埋率的影响

魏慧贤[1,2]， 钟 芳[2]， 麻建国[2]

(1. 江南大学 化学与材料工程学院，江苏 无锡 214122；2. 江南大学 食品学院，教育部食品科学与安全重点实验室，江苏 无锡 214122)

摘 要：研究了用两步乳化法制备W/O/W型复乳时，第二步乳化的乳化工艺参数对复乳的稳定性和药物包埋率的影响规律。以胰岛素为模型药物，用两步乳化法制备W/O/W型复乳，用离心后的乳层保留率评价复乳的稳定性，用高效液相法测定胰岛素在复乳中的包埋率，用激光光散射法测定复乳的粒度分布。实验结果表明，随着第二步乳化过程中乳化强度的提高，复乳滴的粒径减小，复乳的离心稳定性提高而胰岛素包埋率降低。胰岛素包埋率与复乳的粒度分布的关系分为两个区域：当乳化强度较小时，复乳滴的粒径较大，比表面积较小，胰岛素包埋率与体积平均粒径成正比；当乳化强度增大时，复乳滴粒径减小，比表面积增大，胰岛素包埋率与比表面积成反比。在本研究中使胰岛素包埋率最高的第二步乳化过程工艺参数为：VirTishear高速分散均质机分散速度2 000 r/min，分散时间3 min，此工艺下胰岛素的包埋率达到55%。

关键词：W/O/W型复乳；两步乳化法；乳化工艺参数；离心稳定性；胰岛素包埋率

中图分类号：O 648.23 **文献标识码**：A

Influences of Emulsifying Parameters on the Stability and Insulin Encapsulation Efficiency of W/O/W Multiple Emulsions

WEI Hui-xian[1,2]， ZHONG Fang[2]， MA Jian-guo[2]

(1. School of Chemical & Material Engineering, Jiangnan University, Wuxi, 214122, China; 2. Key Laboratory of Food Science and Safety, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi, 214122, China)

Abstract: Influences of emulsifying parameters of the second emulsifying procedure during the preparation of multiple emulsions (MEs) by two-step emulsifying method were investigated with respect to multiple emulsions stability and insulin encapsulation efficiency (IEE). Emulsion stabilities were characterized by centrifugal creaming ratio, IEE were determined by HPLC method. Droplet size distribution were investigated by laser scattering technics. The results shows that emulsifying parameters of the second emulsifying procedure remarkably affected the stability and IEE of MEs. Strong emulsifying parameters improve the stability of MEs by decreasing droplet size of oily drops, but decrease IEE by increasing diffusion area and decreasing

收稿日期：2007-10-12.

基金项目：国家863计划项目(2007AA10Z300)；国家"十一五"科技支撑计划重点项目(2006BAD27B04)；无锡市科技局社会发展项目(CS030011)；江南大学青年基金项目(2007LQN16)

作者简介：魏慧贤(1971-)，女，山东淄博人，工学博士，讲师，主要从事食品化学的研究. Email: chunpu2006@hotmail.com

万方数据

diffusion length. The best emulsifying parameters of the second emulsifying step with respect to IEE were as follow: Vir Tishear emulsifying machine, stirring rate: 2000r/min, stirring time: 3min, with an encapsulation efficiency of insulin 55%.

Key words: W/O/W multiple emulsions; two step emulsifying; emulsifying parameters; centrifugal creaming stability; IEE(insulin encapsulation efficiency)

复乳,全称为"复合乳状液(double emulsions)"或"多重乳状液(multiple emulsions)",是将乳状液分散在另外一种连续相中得到的复合型乳剂[1-2],有水/油/水(W/O/W)、油/水/油(O/W/O)、固/油/水(S/O/W)、水/固/水(W/S/W)等多种类型,以W/O/W和O/W/O两种类型最为常见[2-3],一般通过两步乳化法制备[4-7]。在结构上复乳具有两膜三相的多重隔室结构(图1)。因为这种多重隔室结构有助于实现隔离、保护、持续释放、控制释放、靶向释放、掩藏风味等功能,所以在药剂学、食品、化妆品、乳胶漆、膜分离等许多领域有广阔的应用前景,尤其是在药剂学领域,将W/O/W复乳体系应用于水溶性药物(疫苗、维生素、酶、荷尔蒙)的包埋和控制释放技术的研究非常活跃[8-10]。

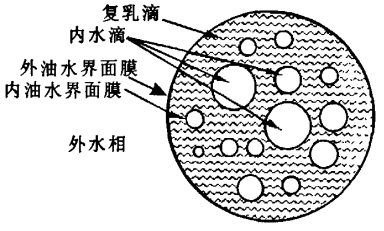


图1 W/O/W型复乳结构示意图

Fig. 1 Schematic illustration of the structure of W/O/W multiple emulsions

但是复乳本质上属于热力学不稳定的多相体系,倾向于以聚集、絮凝、相转变、相分离的形式发生结构的破坏,而所包埋的物质也倾向于在制备及储存过程中以非控制的形式进行释放,这两方面的缺陷限制了复乳的实际应用[11-12]。为了解决这两方面的问题,国内外很多学者从不同的角度进行了很多研究工作[13-18],如选用聚合性大分子乳化剂、巩固复合界面膜、优化油相组成、稳定内水相、改进制备工艺等。本研究中拟考察两步乳化法中第二步乳化过程的工艺参数对复乳的稳定性和药物包埋率的影响规律。两步乳化法指先将油溶性的非离子型乳化剂、内水相、油相混合制得W/O初乳,再把初乳倒入水溶性的非离子型乳化剂的水溶液中乳化制得W/O/W型复乳[19]。通常,第一步乳化过程采用高强度的乳化条件以制备细腻稳定的初乳,而第二步乳化过程应采用较为温和的乳化条件,以免初乳被过分打散而得不到复合乳液结构[2]。作者主要研究第二步乳化工艺参数对复乳稳定性和药物包埋率的影响规律,为W/O/W型复乳的制备和应用提供实践和理论依据。

1 材料与方法

1.1 复乳的制备

以液体石蜡作为油相,以聚合型大分子表面活性剂聚氧乙烯(30)二聚羟基硬脂酸脂(PEG-30 Dipolyhydroxystearate,商品名Arlacel P135,美国ICI公司提供)作为亲脂性乳化剂,以Tween 80和Span 80的质量比1∶1的混合物作为亲水性乳化剂制备复乳;丙酮和无水乙醇质量比1∶1的混合物用于复乳的破乳,以上试剂均为分析纯,除Arlacel P135外都购买自国药集团化学试剂有限公司;胰岛素注射液,40 U/mL,批号0605012,江苏万邦生化医药股份有限公司提供;乙腈,三氟乙酸(TFA),色谱纯,国药集团化学试剂有限公司提供。

将亲油性乳化剂(10%质量分数的Arlacel P135)在50 ℃条件下溶解在液体石蜡中,胰岛素注射液稀释1倍的水溶液作为内水相,内水相与油相的质量比为1∶1,在室温下,在Ultra-Turrax T25高速分散乳化器(IKA-Labortechnik, Germany)上以9 500 r/min的速度边搅拌油相边将内水相缓慢加入,分散时间6 min,制备初乳;然后将10%质量分数的亲水性乳化剂(Tween 80和Span 80的质量比1∶1的混合物)加入外水相,在VirTishear高速分散均质机(Virtis Campany,US)上将初乳分散在外水相中,分散速度取2 000、4 000、6 000 r/min 3个水平,分散时间分别取3、5、8 min 3个水平,按照正交表$L_9(3^4)$安排实验,制备9个样品,分别测定其各项性质,考察复乳的制备工艺参数对复乳的离心稳定性和药物包埋率的影响。

1.2 复乳性质的测定

1.2.1 复乳的粒度分布 复乳的粒径分布用Mi-

万方数据

crotrac Flex 激光光散射粒度测定仪（Microtrac Inc. US）测定,将样品池清洗干净后滴入 2～3 滴复乳样品,使吸光率在 20%～80%范围内,连续相折光指数取 1.333,分散相折光指数为 1.465,用 S3000 程序进行测定,可同时获得体积平均粒径、表面积平均粒径、数均粒径、比表面积、粒径分布等信息。

1.2.2 *复乳的显微观察和显微相片的拍摄*　取少量复乳置于载玻片上,盖上盖玻片,在 Angel AQ－2010C 高倍相差显微仪(镇江安琪精密仪器有限公司提供)上,40 倍物镜下调节显微镜,观察复乳微观结构,并用显微仪自带照相机拍下复乳的显微照片。

1.2.3 *复乳的离心稳定性*　复乳的稳定性用离心分层后的乳层保留率表示。取少量样品置于刻度离心管中,在 TG16-WS 台式高速离心机(0～12 000 r/min,长沙湘仪离心机仪器有限公司提供)中以 800 g 的离心分离因数离心 15 min,读取离心管中的总液体体积及底部析出的水相的体积,用以下方程式(1)计算乳层保留率(ϕ),作为离心稳定性的指标:

$$\phi = \frac{V_t - V_w}{V_t} \times 100\% \qquad (1)$$

式中,V_t 为离心管中乳液的总体积,V_w 为底部析出的水相的体积。

1.2.4 *高效液相法测定胰岛素在复乳中的包埋率*

样品的准备:用去离子水将复乳稀释 5 倍,以 500 g 的分离因数离心 30 min 使之分层,准确移取 1 mL 上层析出的乳层,加入 1 mL 破乳剂(丙酮与乙醇体积比 1∶1 的混合液),振摇 10 min 破乳,以 3 000 g 的分离因数离心 25 min,取水相在高效液相色谱仪(美国安捷伦 Agilent 公司提供)上测定胰岛素的浓度。

高效液相条件:流动相 A 为质量分数 30%的乙腈的质量分数 0.05% TFA 溶液,流动相 B 为质量分数 50%的乙腈的质量分数 0.05% TFA 溶液,色谱柱为 Zorbax SB 200Å C18 色谱柱,4.6 mm×250 mm(美国 Zorbax 公司提供)。梯度洗脱条件:0～15 min,100%A→100%B;15～18 min,100%B→100%A;18～25 min,100%A。体积流量 1 mL/min,柱温 30 ℃,进样量 20 μL。检测:紫外,220 nm;以胰岛素注射液原液为标样,样品中胰岛素浓度的计算为:

$$C_{样品} = \frac{A_{样品}}{A_{标样}} \times 40 \qquad (2)$$

式中,$C_{样品}$ 为样品的浓度,$A_{样品}$ 为样品的峰面积,$A_{标样}$ 为标样的峰面积,40 为标样的浓度,单位 U/mL。胰岛素包埋率的计算公式为:

$$\varphi = \frac{C_{样品} \times 3}{20} \times 100\% \qquad (3)$$

式中,φ 为胰岛素的包埋率,3 是指内水相被稀释了 3 倍,因为按照复乳的配方,内水相在乳层中的体积分数为 50%,将乳层进行破乳时,乳层与破乳剂的体积比为 1∶1,假定破乳后内水相与破乳剂完全混溶,则内水相被稀释 3 倍。20 是指理论上胰岛素全部包封时内水相的浓度 20 U/mL。

2　结果与讨论

2.1　第二步乳化工艺参数对复乳粒度分布的影响

一般的,乳化过程的乳化强度对分散相液滴的粒径有重要影响,乳化过程的本质是依靠剪切所产生的粘性力克服 Laplace 压力梯度,以使分散相发生变形并破裂形成液滴[20],粘性应力的值等于剪切所产生的速度梯度与连续相的黏度的乘积(式 4),

$$F = \eta_c \frac{du}{dx} \qquad (4)$$

式中,η_c 为连续相的黏度,(du/dx) 为剪切所产生的速度梯度,数值上与分散速度成正比,所以随着分散速度的增大,粘性应力增大,分散相液滴粒径将减小,本实验的结果验证了这一理论。由图 2 和图 3 可见,随着第二步乳化过程乳化强度的提高,复乳滴的体积平均粒径减小,平均比表面积增大。当乳化强度从最小的 2 000 r/min,3 min 增加到最强的 6 000 r/min,9 min 时,复乳滴的体积平均粒径从 6.5 μm 降低到 0.37 μm,平均比表面积从 1.44 m^2/m^3 增大到 38.7 m^2/m^3。

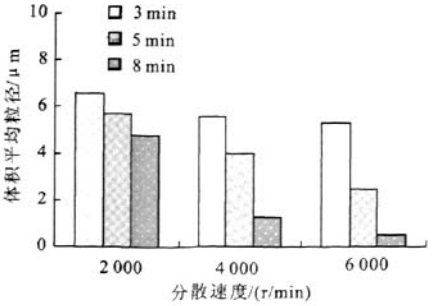


图 2　复乳制备时的分散速度和分散时间对复乳滴的体积平均粒径的影响

Fig. 2　Influences of stirring rate and stirring time of the second emulsifying procedure on the mean size of the oily droplets of the multiple emulsions

万方数据

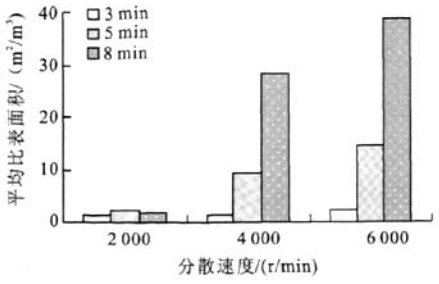
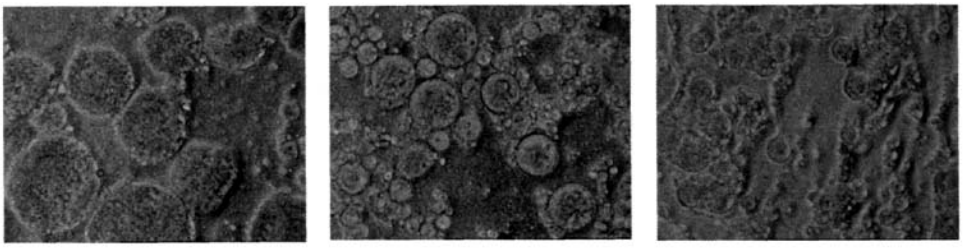


图3 复乳制备时的分散速度和分散时间对复乳滴的平均比表面积的影响

Fig. 3 Influences of stirring rate and stirring time of the second emulsifying procedure on the mean surface of the oily droplets of the multiple emulsions

分散时间的影响同样如此，在本研究中所使用的最高分散速度 6 000 r/min 的搅拌速度下，乳化时间从 3 min 增加到 5 min，所制备的复乳的体积平均粒径从 5.315 μm 降低到 2.489 μm，平均比表面积从 1.4 m^2/m^3 增加到 14.74 m^2/m^3；当乳化时间继续增加到 8 min，所制备的复乳的体积平均粒径从 2.489 μm 降低到 0.513 μm，而复乳滴的平均比表面积从 14.74 m^2/m^3 增加到 38.72 m^2/m^3；说明随着第二步乳化时间的增加，乳化进行得越来越充分，分散液滴的粒径越来越小。在最强的乳化条件(6 000 r/min，8 min)下得到的复乳的体积平均粒径 0.513 μm 已经接近简单乳状液的粒径范畴，说明复乳滴有被过分打散的趋势(图 4)。图 4 中的 3 张显微图片分别是本研究中最弱乳化条件(2 000 r/min，3 min)、中等乳化条件(4 000 r/min，5 min)、最强乳化条件(6 000 r/min，8 min)下得到的复乳的显微照片。由图可知，最强乳化条件得到的复乳滴粒径最小，直观地表明了第二步乳化工艺强度对复乳滴粒径的影响。



(a) 分散速度2 000 r/min 分散时间3 min　(b) 分散速度4 000 r/min 分散时间5 min　(c) 分散速度6 000 r/min 分散时间8 min

图4 第二步乳化时的分散速度和分散时间对复乳滴粒径的影响的显微图片(×40 倍物镜)

Fig. 4 Microscopy of W/O/W multiple emulsions prepared at at different stirring rate and stirring time

2.2 第二步乳化工艺参数对复乳离心稳定性的影响

第二步乳化工艺参数对复乳离心稳定性的影响见图 5。由图可见，随着乳化速度和乳化时间的增大，复乳的离心稳定性提高，这是由随乳化强度提高复乳滴的粒径减小决定的。根据多相体系中的分散相液滴上浮或下沉的沉降速率理论，分散相液滴的上浮或下沉速度与液滴直径的平方根成正比(式 6)。[21]：

$$u_t = \sqrt{\frac{4gd_p(\rho - \rho_p)}{3\rho C_D}} \qquad (6)$$

式中 g 为重力加速度，d_p 为分散相粒子粒径，ρ 为连续相密度，ρ_p 为分散相液滴的密度，C_D 为分散相与连续相相对运动的曳力系数，显然分散相粒子粒径的降低使体系的离心稳定性提高。将复乳的离心稳定性对其体积平均粒径的平方根作图(图 6)，可见二者成反比，相关系数达到 0.915 5。这说明复乳制备时的乳化强度通过影响复乳滴的平均粒径而影响复乳的离心稳定性。使复乳的离心稳定性最好的工艺条件是：6 000 r/min，8 min。

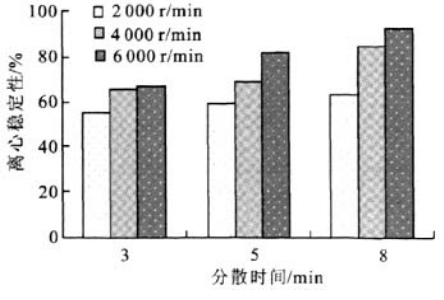


图5 第二步乳化工艺参数对复乳的离心稳定性的影响

Fig. 5 Influences of stirring rate and stirring time of the second emulsifying procedure on stability of the multiple emulsions

万方数据

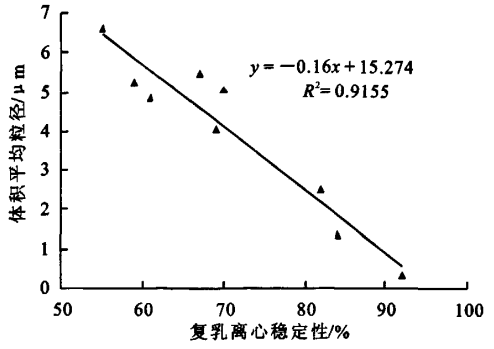


图 6　复乳滴的体积平均粒径与其离心稳定性的关系

Fig. 6　Relationship between mean size of oily droplet of the multiple emulsion and it's stability

2.3　第二步乳化工艺参数对胰岛素包埋率的影响

复乳的乳化工艺参数对复乳胰岛素包埋率的影响规律与对其稳定性的影响规律正相反。如图 7 所示趋势可知，随分散速度和分散时间的增加，复乳的胰岛素包埋率显著降低，当乳化强度从最小的 2 000 r/min，3 min 增加到最强的 6 000 r/min，9 min 时，复乳对胰岛素的包埋率从 55% 降低到 10%。

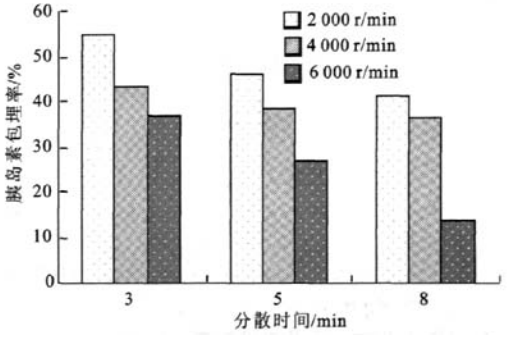


图 7　第二步乳化工艺参数对复乳的胰岛素包埋率的影响

Fig. 7　Influences of stirring rate and stirring time of the second emulsifying procedure on IEE of multiple emulsions

如前所述，乳化强度的提高会导致复乳滴的粒径减小，比表面积增加。在将初乳进行二次乳化形成复乳滴的过程中，初乳相被逐步剪切成小的分散油滴，在此过程中，只有处在初乳相内部的内水滴中的胰岛素才有可能被包埋在油滴中，而被剪切处的内水滴将被打破，与外水相合并，其所溶解的胰岛素便随之进入外水相，不能被包埋。所以，第二步的乳化强度越大，形成的复乳滴的粒径越小，所形成的第二界面越大(平均比表面积越大)，复乳的包埋率越低，这一规律在乳化强度提高，复乳滴的比表面积超过 10 m^2/m^3 以后表现得很显著(图 8)。这一区域内复乳的包埋率与其比表面积成明显的反比关系，相关系数达到 0.945 9，而在比表面积小于 10 m^2/m^3 的范围内，复乳的包埋率与其比表面积的相关系数只有 0.334 9。这是由于在此范围内，胰岛素的包埋率除了受比表面积的影响外，还主要受到包埋在复乳滴内部的内水滴向外水相的迁移释放速度的影响。已发表的文献认为，包埋在内水相中的活性物质可能通过分子扩散、胶束扩散以及整个内水滴向外表面的转移并破裂等几种途径转移到外水相[22-24]，而这几种途径的速度都与复乳滴的大小有关。复乳滴越大，几种途径的转移所需要通过的距离越长，则内部的包埋物的释放越慢。所以，当乳化强度较小造成复乳滴的体积平均粒径较大时，活性物质的包埋率与比表面积的关系的显著性降低，而与体积平均粒径的相关性增大。将此区域内的胰岛素包埋率与体积平均粒径的关系做图(图 9)，可见，在此区域内，胰岛素包埋率与体积平均粒径成正比，相关系数达到 0.890 5，这说明复乳的胰岛素包埋率与其比表面积的关系分为两个区域的论断是正确的。

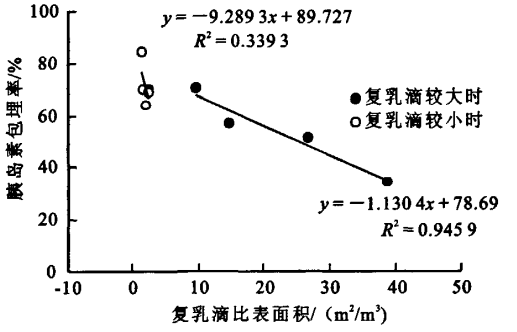


图 8　复乳的胰岛素包埋率与其比表面积的关系分为两个区域

Fig. 8　Relationship between the drug encapsulation efficiency of multiple emulsion and its mean surface is different when the mean size of the oily droplets is different

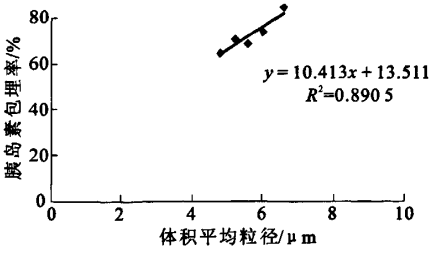


图 9　复乳滴的体积较大时，复乳的胰岛素包埋率与其体积平均粒径成正比

Fig. 9　Direct ratio between drug encapsulation efficiency and mean size of oily droplets of multiple emulsion when the oily droplet are relatively big

万方数据

4 结 语

研究了两步乳化法制备复乳的工艺中第二步乳化工艺参数对复乳的稳定性和药物包埋能力的影响，结果表明，在相同的配方和初乳制备工艺条件下，第二步乳化强度越大，复乳滴的体积平均粒径越小，平均比表面积越大，复乳的离心稳定性提高，但是胰岛素的包埋率降低。具体说来，胰岛素包埋率和体积平均粒径的关系又分为两个区域：当乳化强度较小时，复乳滴的体积较大，内部包埋药物要转移到外水相所要经过的距离增长，药物包埋率与粒径成正比；当乳化强度较大时，复乳滴粒径减小，比表面积增大，界面处内水滴的破裂成为影响胰岛素包埋率的主要因素，药物包埋率与比表面积成反比。本研究结果显示，复乳制备工艺对复乳的离心稳定性和药物包埋率的影响是相反的，要想同时提高药物包埋率和离心稳定性，单从工艺角度来考虑是不够的，需要进行新的探索，如在外水相黏度的改进、界面膜的强化、内水相的固化等方面进行探索。

参考文献(References)：

[1] Muschiolik G, Bunjes H. Multiple Emulsionen[M]. Hamburg: Behr's Verlag; 2007.

[2] 陆彬. 药物新剂型与新技术[M]. 北京：人民卫生出版社，1998:53－103.

[3] Garti N. Double emulsions-scope, limitations and new achievements[J]. **Colloids and Surfaces A, Physichemical and Engimeering Aspects**, 1997 (123－124): 233－246.

[4] Okonogi S, Asano Y, Kumazawa R, et al. Method for producing low fat spread and oil-in-water-in-oil type spread. EP 0452140 B1[P]. 1991-10-16.

[5] Gaonkar A G. Method for preparing a multiple emulsion. US 5322704[P]. 1994-06-21.

[6] Merchant Z M, Gaonkar A G, Nicholson V J, et al. Flavor delivery system. EP 0815743[P]. 1998-01-07.

[7] Masatsugu Y. Mushroom extract-containing composite emulsion. JP 2005185180 A[P]. 2005-07-14.

[8] Daisuke W, Noriko I, Akira U, et al. Fat-soluble vitamins-containing food and drink product, and method for stabilizing fat-soluble vitamins. JP 2004097113 A[P]. 2004-04-02.

[9] Tedajo G M, Bouttier S, Fourniat J, et al. Release of antiseptics from the aqueous compartments of a W/O/W multiple emulsion[J]. **International Journal of Pharmaceutics**, 2005,288: 63－72.

[10] Dahms G H, Tagawa M. Novel multiple-phase emulsions for stable incorporation of Vitamin C derivatives and enzymes [C]. Sydney: 19th IFSCC Congress, 1996.

[11] Florence A T, Whitehill D. The formulation and stability of multiple emulsions[J]. **Int J Pharm**, 1982(11):277－308.

[12] Hai Mingtan, Sholmo Magdassi, Investigation on the release of fluorescent markers from W/O/W emulsions by fluorescence-activated cell sorter[J]. **Journal of Controlled Release**, 2004,96: 393－402.

[13] Lobato-Calleros C, Rodriguez E, Sandoval-Castilla O, et al. Reduced-fat white fresh cheese-like products obtained from$W_1/O/W_2$ multiple emulsions: viscoelastic and high-resolution image analyses[J]. **Food Res Int**, 2006,39:678－685.

[14] Florence A T, Whitehill D. The formulation and stability of multiple emulsions[J]. **Int J Pharm**, 1982(11):277－308.

[15] Garti N, Bisperink C. Double emulsions: progress and applications[J]. **Curr Opin Colloid Interface Sci**, 1998(3):657－667.

[16] Ficheux M-F, Bonakdar L, Leal-Calderon F, et al. Some stability criteria for double emulsions[J]. **Langmuir**, 1998,14: 2702－2706.

[17] Dickinson E, McClements D J. Water in-oil-in-water multiple emulsions[M]. Advances in food colloids. London: Blackie Academic and Professional, 1996:280－300.

[18] Garti N, Benichou A. Recent developments in double emulsions for food applications[M]. Friberg E, Larsson K, Sjöblom J. Food emulsions. New York: Marcel Decker, 2004:353－412.

[19] Matsumoto S, Kita Y, Yonezawa D. An attempt at preparing water-in-oil-in-water multiple phase emulsions[J]. **Journal of Colloid and Interface Science**, 1976, 57(2): 353－361.

[20] Walstra P,Becher P. Encyclopedia of Emulsion Technology[M]. New York:Maecel Dekker, 1983.

[21] Tadros T F. Solid/Liquid Dispersions[M]. London: Academic Press,1987.

[22] Garti N, Magdassi S, Whitehill D, Transfer phenomena across the oil phase in water-in oil-in water multiple emulsion evaluated by Coulter Counter I. Effect of emulsifier I on water permeability[J]. **J Colloid Interface Sci**, 1985,104: 587－591.

[23] Mohammed Leadi Cole, Release rate profiles of thephylline and insulin from stable multiple W/O/W emulsions[J]. **Journal of Controlled Release**, 1997,49: 51－58.

[24] Genty M. Characterization of a complex dispersion of multilamellar vesicles[J]. **Colloid Polym Sci**, 2003,282: 32－40.

(责任编辑：秦和平)

万方数据