

## 蛇油纳米乳的制备及稳定性评价

李藤藤<sup>1</sup>, 徐东升<sup>2</sup>, 吴迪<sup>1</sup>, 李琪<sup>3</sup>, 娄小倩<sup>4</sup>, 李相军<sup>1</sup>, 任立群<sup>1</sup>

(1. 吉林大学药学院, 实验药理与毒理学教研室, 长春 130021; 2. 吉林大学第一医院 肿瘤科, 长春 130000; 3. 锦州医科大学附属第三医院 病理科, 辽宁 锦州 120001; 4. 吉林大学第一医院 内分泌科, 长春 130021)

**摘要:**通过水相滴定法制备蛇油纳米乳, 研究了混合油相、表面活性剂、助表面活性剂对蛇油纳米乳制备的影响, 并利用伪三元相图法确定最佳蛇油纳米乳配方。结果表明: 混合油相选择蛇油和肉豆蔻酸异丙酯(IPM), 表面活性剂选择 Span80 和 Tween80 二者质量比 27:73, 助表面活性剂选择 PEG400; 最佳蛇油纳米乳配方为蛇油 1.6 g、IPM 2.4 g、Span80 1.08 g、Tween80 2.92 g、PEG400 4.0 g、水 8.0 g。所制得的蛇油纳米乳为 O/W 型, 平均粒径为 63.01 nm, PDI 为 0.226, Zeta 电位为 -19 mV, 液滴外观为圆形, 粒径均匀且状态良好; 离心后清澈透明, 不分层; 不耐高温, 需要在 25℃ 以下贮存; 冷冻后, 可以在室温下恢复到初始状态; 氧化稳定性较蛇油提高。

**关键词:**蛇油; 纳米乳; 制备; 稳定性; 粒径; PDI; Zeta 电位

中图分类号: TS225.2; TQ423 文献标识码: A 文章编号: 1003-7969(2021)11-0021-06

### Preparation and stability of snake oil nanoemulsion

LI Tengteng<sup>1</sup>, XU Dongsheng<sup>2</sup>, WU Di<sup>1</sup>, LI Qi<sup>3</sup>, LOU Xiaoqian<sup>4</sup>,  
LI Xiangjun<sup>1</sup>, REN Liqun<sup>1</sup>

(1. Department of Experimental Pharmacology and Toxicology, School of Pharmacy, Jilin University, Changchun 130021, China; 2. Department of Oncology, The First Hospital of Jilin University, Changchun 130000, China; 3. Department of Pathology, The Third Affiliated Hospital of Jinzhou Medical University, Jinzhou 120001, Liaoning, China; 4. Department of Endocrinology, The First Hospital of Jilin University, Changchun 130021, China)

**Abstract:** The snake oil nanoemulsion was prepared by water phase titration. The effects of mixed oil phase, surfactant and cosurfactant on the preparation of snake oil nanoemulsion were studied. The pseudo three phase diagram method was used to determine the optimal formula of snake oil nanoemulsion. The results showed that snake oil and isopropyl myristate (IPM) were selected as the mixed oil phase, Span80 and Tween80 with mass ratio of 27:73 as the surfactants, PEG400 as the cosurfactant. The optimal formula of snake oil nanoemulsion was obtained as follows: snake oil 1.6 g, IPM 2.4 g, Span80 1.08 g, Tween80 2.92 g, PEG400 4.0 g and water 8.0 g. The snake oil nanoemulsion was O/W type. The average partical size, PDI and Zeta potential of snake oil nanoemulsion were 63.01 nm, 0.226 and -19 mV, respectively, and the droplet appearance was round, the partical size was uniform and in good state. After centrifugation, snake oil nanoemulsion was clear and transparent without stratification. It was not resistant to high temperature and needed storing below 25℃. After freezing, it could be restored to its original state at room temperature. Its oxidation stability was higher than snake oil.

**Key words:** snake oil; nanoemulsion; preparation; stability; particle size; PDI; Zeta potential

收稿日期: 2020-12-29; 修回日期: 2021-08-09

基金项目: 吉林省重点科技研发项目(20180201007YY)

作者简介: 李藤藤(1995), 女, 在读硕士, 研究方向为心血管药理学(E-mail) 17865650090@163.com。

通信作者: 李相军, 副教授, 博士(E-mail) lxj@jlu.edu.cn; 任立群, 教授(E-mail) renlq@jlu.edu.cn。

蛇油由蛇腹内剥离的脂肪经加工炼制而成。我国及东南亚民间有长期用蛇油治疗冻疮、烫伤、皮肤皴裂、慢性湿疹以及疮痍疔肿的传统。李时珍《本

草纲目》中记载,“魔著物,皆透也”,表明蛇油具有渗透性和消肿功效。对蛇油成分分析表明,蛇油中含有多达 29 种脂肪酸,其中不饱和脂肪酸含量达 60% 以上。现代药理学研究证明,蛇油是一种既富有营养又利于保健的物质,可以直接渗透人体皮肤,促进皮肤细胞新陈代谢,增强细胞活力,具有抗皮肤衰老作用,同时可抑制皮肤表面有害细菌和螨虫生长,增强皮肤免疫调节功能<sup>[1]</sup>。作为传统的纯天然护肤品,蛇油质地细腻,使用时感觉清凉、舒适,且与人体肌肤的生理生长特征有着极佳的配伍和互补性,对皮肤有着很好的渗透、滋润、修复作用,非常适合理疗和保养肌肤。但是蛇油富含不饱和脂肪酸,极易氧化、不易保存,而且黏性大、腥味重,限制了其应用。因此,开发蛇油成分含量高、性质稳定、无严重异味的蛇油产品作为化妆品、药品及保健品对扩大蛇油应用范围具有重要意义。

纳米乳为由水相、油相、表面活性剂及助表面活性剂按照合适比例所形成的热力学稳定体系,纳米乳可以是水包油(O/W)型、油包水(W/O)型或及双连续(W/O/W 或 O/W/O)型透明或半透明的胶体分散体系,乳液粒径为 10 ~ 100 nm,具有粒径小、渗透性强、表面张力和油水界面张力低、润湿性强等优点,在材料、食品、医药、保健、护肤等领域受到广泛关注和应<sup>[2-4]</sup>。本研究以蛇油为原料制备一种方法简单、性质稳定的纳米乳,以期作为药物及美容护肤等产品提供新的载体。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

蛇油,吉林省辉南县翔龙养蛇有限公司;乙酸乙酯、乙酸异丙酯、肉豆蔻酸异丙酯(IPM)、吐温 20(Tween20)、吐温 80(Tween80)、司盘 20(Span20)、司盘 80(Span80)、无水乙醇、1,2-丙二醇、丙三醇、聚乙二醇 400(PEG400)、苏丹红、亚甲基蓝,均为分析纯。

JJ200 型精密电子天平(美国双杰兄弟(集团)有限公司),85-2 型恒温磁力搅拌器,冷冻离心机,KQ3200DE 型医用数控超声波清洗器,XW-80A 旋涡混合器,HH-W-420 数显恒温水箱,Zetasizer NANO-ZS 90 型激光粒度分析仪(英国 Malvern 公司),Tecnai G2 spirit BioTwin 型透射电子显微镜(美国 FEI 公司)。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 蛇油纳米乳的制备

将蛇油和溶剂混合得到混合油相,表面活性剂和助表面活性剂按一定质量比( $K_m$ )混合得到混合

表面活性剂,然后采用水相滴定法制备蛇油纳米乳,即将混合油相与混合表面活性剂按一定质量比混匀,逐滴加入蒸馏水,不断搅拌直至形成澄清透明的乳液。

#### 1.2.2 混合油相的选择

分别取 0.5 g 乙酸乙酯、乙酸异丙酯、IPM 置于不同具塞锥形瓶中,各加入 10 g 蛇油,于 37 °C 水浴条件下超声(30 Hz,50 W)1 h,采用减重法测定蛇油在各溶剂中的溶解度,选择蛇油溶解度最大的溶剂与蛇油混合作为混合油相。

#### 1.2.3 表面活性剂的选择

取 4 支 15 mL 离心管,每支离心管中分别加入 3 g 蛇油,然后分别加入 0.5 g Span20、Span80、Tween20、Tween80,涡旋振荡器振荡 10 s,使其充分混合均匀。4 支离心管中再分别加入三蒸水使其总体积为 10 mL,涡旋振荡 3 min,使其充分混合均匀。室温静置计时,观察静置不同时间试管中乳液的分层情况,记录下层体积<sup>[5]</sup>,考察表面活性剂的乳化效果。

选择两种乳化效果较好的表面活性剂,按照不同的配比,采用上述同样的方法,得到复合表面活性剂的最佳配比,并计算复合表面活性剂的 HLB 值。

采用筛选的单一表面活性剂以及最佳配比的复合表面活性剂,将其与助表面活性剂 PEG400 以  $K_m$  为 1:1 混合得到混合表面活性剂,再按照混合油相与混合表面活性剂以 9:1 ~ 1:9 的质量比混匀,逐滴加入蒸馏水,不断搅拌直至形成澄清、透明的乳液,并记录当体系发生变化时的临界滴水量,以蛇油、混合表面活性剂和水分别作为三角形的 3 个顶点,绘制伪三元相图,比较不同表面活性剂下形成的蛇油纳米乳的区域面积。

#### 1.2.4 助表面活性剂的选择

选用毒副作用小的无水乙醇、1,2-丙二醇、丙三醇、PEG400<sup>[6]</sup>作为助表面活性剂,将 1.2.3 筛选的复合表面活性剂与助表面活性剂按质量比 1:1 混合均匀后,盛于洁净的离心管中,在 1500 r/min 下离心 15 min 后,根据分层情况初步选择能够制备稳定的蛇油纳米乳的助表面活性剂。

#### 1.2.5 $K_m$ 的确定

将 1.2.3 筛选的复合表面活性剂和 1.2.4 筛选的助表面活性剂按  $K_m$  分别为 1:1、2:1 和 1:2 混匀形成混合表面活性剂,再按照混合油相与混合表面活性剂以 9:1 ~ 1:9 的质量比混匀,逐滴加入蒸馏水,不断搅拌直至形成澄清、透明的乳液,并记录当

体系发生变化时的临界滴水量,以蛇油、混合表面活性剂和水分别作为三角形的3个顶点,绘制伪三元相图,比较不同  $K_m$  下形成的蛇油纳米乳的区域面积。

### 1.2.6 配方选择

按质量比 9:1 ~ 1:9 将 1.2.5 筛选的混合表面活性剂与混合油相充分混合均匀,逐滴加入蒸馏水,不断搅拌直至形成澄清、透明的乳液,并记录当体系发生变化时的临界滴水量,以蛇油、混合表面活性剂和水分别作为三角形的3个顶点,绘制伪三元相图,选择形成蛇油纳米乳区域面积最大时的比例作为蛇油纳米乳的最优配方。

### 1.2.7 蛇油纳米乳的表征

#### 1.2.7.1 蛇油纳米乳类型的判别

通过澄清度、分层现象初步判断是否形成蛇油纳米乳。将苏丹红和亚甲基蓝分别滴加在蛇油纳米乳中,观察二者的扩散速度,若苏丹红扩散速度快,则为油包水(W/O)型,若亚甲基蓝扩散速度快,则为水包油(O/W)型<sup>[7]</sup>。

#### 1.2.7.2 蛇油纳米乳的外观

通过澄清度、丁达尔现象初步判断是否形成蛇油纳米乳的外观。

#### 1.2.7.3 蛇油纳米乳的形态、平均粒径、多分散性及 Zeta 电位

取适量的蛇油纳米乳,用蒸馏水稀释 1 000 倍,滴在覆盖有碳膜的铜网上,滴加 2% 磷酸酸溶液染色 4 min,自然挥发并干燥后观察蛇油纳米乳在透射电子显微镜下的形态。

取 0.1 mL 蛇油纳米乳并稀释 50 倍,在室温下使用激光粒度分析仪测定蛇油纳米乳的平均粒径、多分散性指数(PDI)以及 Zeta 电位<sup>[8]</sup>。

### 1.2.8 蛇油纳米乳的物理稳定性测定<sup>[9]</sup>

#### 1.2.8.1 离心实验

将制备的蛇油纳米乳样品于 10 000 r/min 离

心 20 min 后,观察样品是否出现分层和沉淀现象,若样品中出现浑浊或分层的现象则为不稳定。

#### 1.2.8.2 温度实验

取 3 批蛇油纳米乳密封于透明玻璃容器中,分别放置于 4、25℃ 和 50℃ 条件下,15 d 后观察其外观变化,并测定平均粒径。

#### 1.2.8.3 冻融实验

将蛇油纳米乳在 -20℃ 冰箱中放置 24 h,取出放置在室温下,观察其短时间内形态的恢复情况,重复 2~3 次。热力学稳定的蛇油纳米乳在 2~3 min 内可恢复到初始形态。

### 1.2.9 蛇油纳米乳的氧化稳定性测定

分别取蛇油纳米乳和蛇油于透明玻璃容器中,在室温自然条件下密封贮藏 10 d,每 2 d 取样测定过氧化值。过氧化值采用硫氰酸铁法<sup>[10]</sup>进行测定。

## 2 结果与分析

### 2.1 混合油相的选择

蛇油本身即可作为油相,但因为自身溶解性小,流动性差,单一油相难以满足条件,需要进行不同油相的混合。实验表明,与乙酸乙酯、乙酸异丙酯相比,蛇油在 IPM 中的溶解度最大,约为 0.67 g/g。因此,选择 IPM 和蛇油作为蛇油纳米乳的混合油相。

### 2.2 表面活性剂的选择

表面活性剂根据分子组成特点和极性基团的解离性质可以分为离子型和非离子型表面活性剂。离子型表面活性剂一般毒性较大,多用于去污剂、消毒、杀菌等。非离子型表面活性剂稳定性好,不易受电解质与溶液 pH 的影响,毒性低,因此本研究采用无毒的非离子型表面活性剂<sup>[11]</sup>,初步选择 Span 类和 Tween 类作为表面活性剂。单一表面活性剂的乳化效果如表 1 所示。

表 1 单一表面活性剂的乳化效果

乳化剂	HLB 值	下层体积/mL					
		5 min	15 min	30 min	45 min	60 min	100 min
Span20	8.6	3.5	3.8	4.2	4.8	5.6	6.0
Span80	3.7	0	0	0.3	0.8	1.0	1.2
Tween20	16.7	2.6	4.2	5.0	5.2	5.8	6.2
Tween80	15.0	0	0	0	0.2	0.5	0.5

由表 1 可见:Span20 和 Tween20 作为表面活性剂时,在短时间内出现分层现象,乳液的稳定性较差;Span80 和 Tween80 作为表面活性剂时,在短

时间内未出现分层现象,乳液稳定性较好,所以选择 Span80 和 Tween80 进行表面活性剂的复配。

复合表面活性剂的乳化效果如表 2 所示。

表2 复合表面活性剂的乳化效果

Span80 添加量/%	Tween80 添加量/%	HLB 值	下层体积/mL					
			5 min	15 min	30 min	45 min	60 min	100 min
93.0	7.0	5	1.3	1.9	2.2	2.5	2.5	2.5
74.7	25.3	7	0.9	1.4	2.0	2.8	2.8	2.8
56.0	44.0	9	1.8	2.4	3.1	3.7	3.7	3.7
37.0	63.0	11	0	0.4	0.7	0.9	0.9	0.9
27.0	73.0	12	0	0	0	0.5	0.5	0.5
18.7	81.3	13	0	0	0.3	0.7	0.7	0.7

由表2可见,当复合表面活性剂 Span80 和 Tween80 的 HLB 值为 12 时,乳液稳定性最好,能保持长时间不分层,此时 Span80 和 Tween80 质量比为 27:73。

以混合油相、表面活性剂、水相为 3 个坐标绘制

伪三元相图,结果如图 1 所示。由图 1 可知, Span80 - Tween80 (质量比 27:73) 复配所制备的蛇油纳米乳形成较大的区域面积,呈现良好的乳液稳定性。因此,选择复合表面活性剂 Span80 - Tween80 (质量比 27:73)。

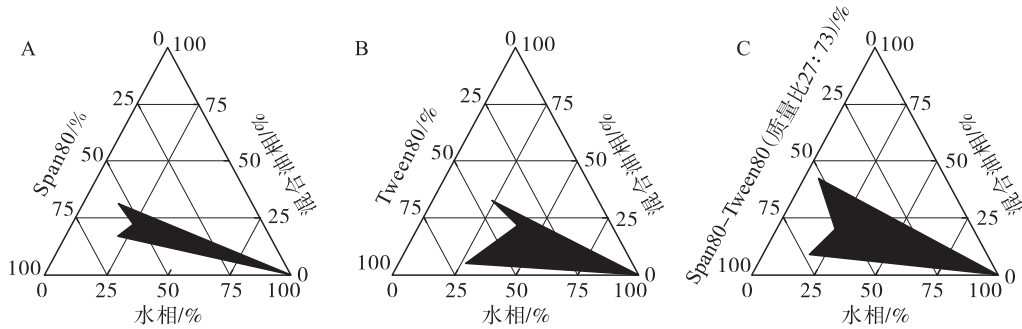


图1 不同表面活性剂时蛇油纳米乳的伪三元相图

### 2.3 助表面活性剂的选择(见表3)

表3 助表面活性剂筛选结果

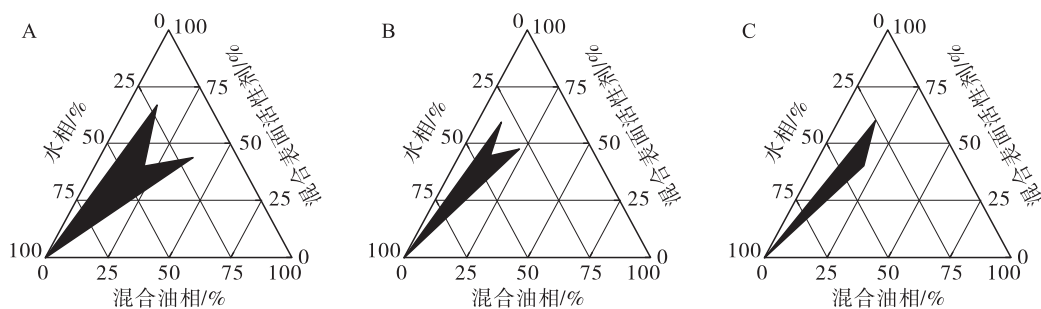
无水乙醇	1,2-丙二醇	丙三醇	PEG400
不分层	出现分层	出现分层	不分层

由表3可知,无水乙醇与 PEG400 均能作为蛇油纳米乳的助表面活性剂,PEG400 在化妆品中应

用广泛,能起到保湿、促进活性物质渗透皮肤等功效,因此选择 PEG400 作为助表面活性剂。

### 2.4 $K_m$ 的确定

$K_m$  是影响相性质,即蛇油纳米乳区域的面积和位置<sup>[12-13]</sup>的关键因素。为了进一步优化系统,评估了  $K_m$  对蛇油纳米乳形成的影响,结果见图2。



注:A.  $K_m = 1:1$ ; B.  $K_m = 2:1$ ; C.  $K_m = 1:2$ 。

图2 不同  $K_m$  时蛇油纳米乳的伪三元相图

当单独使用复合表面活性剂而没有助表面活性剂时发现,蛇油纳米乳区域面积较小。由图2可知,  $K_m$  为 1:1 时,蛇油纳米乳区域面积较大,这可能是由于界面张力的进一步降低,界面的流动性增加所致。随着表面活性剂质量的进一步增加,即  $K_m$  为 2:1 时,蛇油纳米乳面积区域减小。当  $K_m$  为 1:2

时,蛇油纳米乳区域面积也减少。因此,确定蛇油纳米乳的  $K_m$  为 1:1。

### 2.5 配方选择

按 1.2.6 方法进行实验,结果表明,当  $m$  (混合油相):  $m$  (混合表面活性剂):  $m$  (蒸馏水) = 1:2:2 时,形成的蛇油纳米乳区域面积最大,因此蛇

油纳米乳的最佳配方为蛇油 1.6 g、IPM 2.4 g、Span80 1.08 g、Tween80 2.92 g、PEG400 4.0 g、水 8.0 g。

## 2.6 蛇油纳米乳的表征参数

### 2.6.1 蛇油纳米乳的类型

在扩散实验中,亚甲基蓝在蛇油纳米乳中的扩散速度大于苏丹红的扩散速度,因此确定所制备的蛇油纳米乳为 O/W 型。

### 2.6.2 蛇油纳米乳的外观

所制备的蛇油纳米乳澄清透明,呈淡黄色;当一束光线透过蛇油纳米乳时可以观察到一条光亮的“通路”,说明蛇油纳米乳具有丁达尔现象。

### 2.6.3 蛇油纳米乳的形态、平均粒径、多分散性及 Zeta 电位

蛇油纳米乳的形态见图 3。由图 3 可知,所制备的蛇油纳米乳液滴的外观呈圆形,粒径均匀且状态良好。

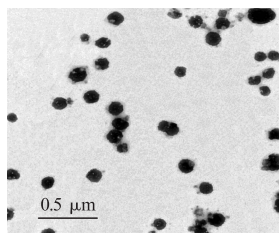


图 3 蛇油纳米乳的形态

蛇油纳米乳的平均粒径为 63.01 nm, PDI 为 0.226, Zeta 电位为 -19 mV。

## 2.7 蛇油纳米乳的稳定性

### 2.7.1 离心实验

蛇油纳米乳经 10 000 r/min 离心 20 min 后仍保持澄清透明,无分层现象,说明制备的蛇油纳米乳的稳定性良好。

### 2.7.2 温度实验

在 25 °C 下蛇油纳米乳可长时间保持澄清透明状态,不会出现分层、絮凝和破乳现象,平均粒径变化不大(见表 4),可长期保存。50 °C 下蛇油纳米乳颜色变深,出现分层现象,粒径变大(见表 4),蛇油纳米乳的结构被破坏。

表 4 温度对蛇油纳米乳平均粒径的影响

样品批次	不同温度下平均粒径/nm		
	4 °C	25 °C	50 °C
1	49.7	50.5	87.2
2	49.2	49.9	70.9
3	49.6	50.3	84.7

### 2.7.3 冻融实验

蛇油纳米乳在 -20 °C 冷冻 24 h 后取出,可以在

2~3 min 恢复到初始状态。

## 2.8 蛇油纳米乳的氧化稳定性(见图 4)

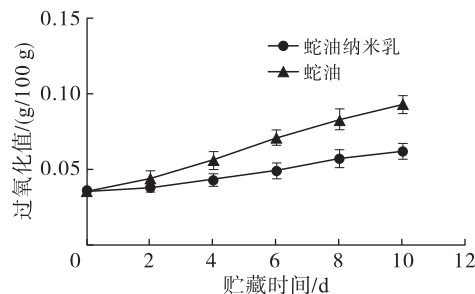


图 4 蛇油纳米乳过氧化值随贮藏时间的变化

由图 4 可知,在室温贮藏 10 d 的过程中,蛇油纳米乳和蛇油的过氧化值都有所上升,但蛇油的上升幅度明显高于蛇油纳米乳,且蛇油的过氧化值普遍高于同期蛇油纳米乳的过氧化值。说明蛇油纳米乳的氧化稳定性较蛇油有所提高。

## 3 结论

实验研究了蛇油纳米乳的制备并对其稳定性进行评价。结果表明:混合油相选择蛇油和肉豆蔻酸异丙酯(IPM),表面活性剂选择 Span80 和 Tween80,二者质量比 27:73,助表面活性剂选择 PEG400,蛇油纳米乳最佳配方为蛇油 1.6 g、IPM 2.4 g、Span80 1.08 g、Tween80 2.92 g、PEG400 4.0 g、水 8.0 g,所制得的蛇油纳米乳为 O/W 型,平均粒径为 63.01 nm, PDI 为 0.226, Zeta 电位为 -19 mV,液滴外观为圆形,粒径均匀且状态良好;蛇油纳米乳离心后清澈透明,不分层,不耐高温,需要在 25 °C 以下储存,冷冻后可以在室温下恢复到原始状态,氧化稳定性较蛇油提高。

## 参考文献:

- [1] 司昀灵,胡招龙,邹立强,等. 单甘酯与蜂蜡复配制备五步蛇油凝胶油的研究[J]. 中国油脂, 2019, 44(7): 147-152.
- [2] YANG S P, LIU H L, WANG C G, et al. Effect of oxidized fish oil on growth performance and oxidative stress of *Litopenaeus vannamei*[J]. Aquacult Nutr, 2015, 21(1): 121-127.
- [3] BAINUN I N, HASHIMAH A N, SYED - HASSAN S S A. Nanoemulsion: formation, characterization, properties and applications; a review [J]. Adv Mat Res, 2015, 1113: 147-152.
- [4] AHMED K, LI Y, MCCLEMENTS D J, et al. Nanoemulsion - and emulsion - based delivery systems for curcumin: encapsulation and release properties [J]. Food Chem, 2012, 132(2): 799-807.

(下转第 49 页)

