

药物纳米晶自稳定 Pickering 乳液给药系统研究的关键问题

张继芬¹, 董芳明¹, 刘川², 易涛^{3*}

(1. 西南大学药学院, 重庆 400716; 2. 成都市食品检验研究院, 四川 成都 611130; 3. 澳门理工大学健康科学及体育学院, 澳门 999078)

摘要: 药物纳米晶自稳定 Pickering 乳液 (drug nanocrystals self-stabilized Pickering emulsion, DNSPE) 是一种以药物自身纳米晶为稳定剂的新型 Pickering 乳液, 近年来在药物递送领域的研究越来越多。本文在总结药物递送 DNSPE 研究现状的基础上, 全面综述影响其构建的主要因素、性质与结构的表征方法、体内命运等关键问题的研究进展, 并展望产业化前景, 以期深化 DNSPE 的全面研究, 促进其在药物递送领域的应用提供参考。

关键词: Pickering 乳液; 药物递送; 纳米晶; 结构表征; 体内命运

中图分类号: R943 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)06-1582-11

Key issues in the study of drug nanocrystals self-stabilized Pickering emulsions as drug delivery system

ZHANG Ji-fen¹, DONG Fang-ming¹, LIU Chuan², YI Tao^{3*}

(1. College of Pharmaceutical Sciences, Southwest University, Chongqing 400716, China; 2. Chengdu Institute of Food Inspection, Chengdu 611130, China; 3. Faculty of Health Sciences and Sports, Macao Polytechnic University, Macao 999078, China)

Abstract: Drug nanocrystals self-stabilized Pickering emulsion (DNSPE) is a novel Pickering emulsion with drug nanocrystals as the stabilizer. There are more and more researches on DNSPE in the field of drug delivery in recent years. On the basis of summarizing the research status of DNSPE used as drug delivery systems, this paper comprehensively reviewed the research progress of three key issues, such as the main factors affecting construction of DNSPE, characterization methods of properties and structures, and *in vivo* fate, and looked forward to the industrialization prospect, which is beneficial to deepen the comprehensive research of DNSPE and promote its application in the field of drug delivery.

Key words: Pickering emulsion; drug delivery; nanocrystal; structure characteristic; fate *in vivo*

Pickering 乳液是一种基于超细的固体微粒在乳滴水/油界面的吸附而阻止乳滴相互碰撞、聚集合并的乳液。早期的 Pickering 乳液多是以二氧化硅、二氧化钛、碳酸钙、氧化铁等无机粒子为固体微粒稳定剂^[1], 但无机颗粒的可降解性和生物相容性较差, 用于给药系统

存在一定的安全隐患。后来, 诸多食品来源的有机微粒, 如脂肪、蛋白、淀粉、壳聚糖、纤维素等固体微粒被用于稳定 Pickering 乳液, 提高了乳液的安全性^[2-4]。

近年来一种新型的药物纳米晶自稳定 Pickering 乳液 (drug nanocrystals self-stabilized Pickering emulsions, DNSPE) 受到越来越多关注。DNSPE 是一种以难溶性药物自身纳米晶作为稳定剂的新型 Pickering 乳液, 它不含表面活性剂、异种固体微粒等其他辅料, 消除了辅料带来的安全隐患; 难溶性药物除了溶解于油滴中, 还以纳米晶形式吸附于油滴表面, 提高了载药量。这些

收稿日期: 2023-09-01; 修回日期: 2024-04-18.

基金项目: 重庆市科卫联合中医药科研项目重点项目 (2023ZDXM034); 澳门科学技术发展基金资助项目 (0061/2023/RIA1); 澳门理工大学资助研究项目 (RP/FCSD-01/2023).

*通讯作者 Tel: 86-853-85993471, E-mail: yitao@mpu.edu.mo

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-1022

优点使 DNSPE 在给药系统中具有良好的应用前景, 已成功用于诸多难溶性药物的口服给药, 近年来在注射给药中也崭露头角。

作为一种新型乳液 DNSPE 有很多重要问题值得探究。本文总结了 DNSPE 在药物递送中的应用现状, 综述了影响 DNSPE 构建的主要因素、DNSPE 结构表征方法、体内命运三方面关键问题的研究进展, 并对 DNSPE 未来的重点研究方向和产业化前景进行展望, 以期对 DNSPE 在药物递送中的拓展研究提供参考。

1 DNSPE 在药物递送领域的应用现状

从来源广泛、安全的食品原料中探寻可用作 Pickering 乳液稳定剂的固体微粒是近年来 Pickering 乳液研究的热点之一。除了大量蛋白、多糖、脂肪、纤维素被用作固体微粒稳定剂外, 不少食物来源的小分子物质, 如二氢杨梅素、木犀草素、熊果酸、薯蓣皂苷元、甘草酸、芦丁、柚皮苷、姜黄素、银杏提取物等被用作固体微粒稳定剂^[5]。这些小分子物质大多具有一定的药理活性。虽然目前已有不少生物活性成分的纳米晶为稳定剂的 Pickering 乳液的报道, 但用作药物递送系统的 DNSPE 研究仍不多, 主要包括以下方面。

1.1 DNSPE 口服给药, 提高难溶性药物的口服生物利用度

以蛋白、淀粉等为稳定剂的 Pickering 乳液已广泛用于活性物质, 如咖啡因、维生素 D3、 β -胡萝卜素、布洛芬等的口服递送, 用于提高口服吸收、控制释药速率或提高药物在胃肠道的稳定性^[6]。以活性药物的纳米晶为稳定剂的 DNSPE 自首次被报道可提高难溶性药物水飞蓟宾的口服生物利用度后, 又被用于姜黄素、槲皮素、葛根素等难溶性药物, 甚至包括中药复方药效组分的口服递送。

水飞蓟宾具有保护正常肝脏细胞、促进受损害肝细胞恢复的功效, 临床上用于治疗急慢性肝炎、肝硬化及中毒性肝损伤。但水飞蓟宾的水溶性和膜渗透性都很差, 口服吸收差。Zhang 等^[7]将粒径为 300 nm 左右的水飞蓟宾纳米晶与油相 Capmul C8 混合, 高压均质法制得乳滴粒径为 27.3 μm 的水飞蓟宾 DNSPE。相较于纳米晶混悬液, 水飞蓟宾的 DNSPE 稳定性显著提高, 室温放置 40 天仍稳定, 而纳米晶混悬液 4 天后明显分层。大鼠灌胃给药后, 水飞蓟宾 DNSPE 的 AUC_{0-t} 分别为原料药混悬液和纳米晶混悬液的 4.0 和 1.6 倍, C_{max} 分别为其 3.6 和 2.5 倍。由此可见, DNSPE 显著提高了水飞蓟宾的口服吸收, 效果优于纳米晶混悬液。

槲皮素具有抗炎、抗氧化、抗高血压和神经保护等多种药理作用, 但它在水中的溶解度仅为 $0.01 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 严重限制了其口服吸收。Wang 等^[8]以 Labrafac Lipophile

WL 1349 为油相, 开发了槲皮素 DNSPE。DNSPE 的药物释放和口服吸收不仅高于槲皮素原料药, 也优于纳米晶。DNSPE 在磷酸盐缓冲液 ($\text{pH} = 7.4$, 含 1% 十二烷基硫酸钠) 24 h 的累计释药率为 68.88%, 高于原料药的 20.15% 和纳米晶的 50.71%; 大鼠灌胃 DNSPE 后的 AUC_{0-t} 分别是原料药和纳米晶的 2.8 和 1.4 倍, C_{max} 分别为 2.4 和 1.4 倍。此外, 姜黄素^[9]、熊果酸^[10]等难溶性药物也尝试采用 DNSPE 提高其口服生物利用度。遗憾的是文献仅对其制备工艺、稳定机制等进行了报道, 未见口服吸收效果方面的研究结果。

以上 DNSPE 多是以中链脂肪酸甘油酯为油相。鉴于不少中药同时含有难溶性和挥发油类药效成分, 笔者率先提出以中药的难溶性药效成分纳米晶为稳定剂, 以中药挥发油为油相, 制备“药辅合一”^[11]的中药复方 DNSPE。难溶性药效成分和挥发油都既是“药”又是“辅”, 二者还有望发挥协同药效。葛根、川芎、丹参组成的通脉方是活血化瘀的经典方剂, 葛根素、阿魏酸、川芎油、丹酚酸 B、丹参酮 II A 均为其重要的药效物质。笔者^[12]以葛根素纳米晶为固体微粒, 以川芎油和 Fabrafil M 1944 C (9:1, v/v) 为油相, 开发了葛根素 DNSPE。大鼠口服吸收研究显示, DNSPE 能显著提高葛根素的口服吸收: DNSPE 的 AUC_{0-t} 相对于原料药、纳米晶和普通乳分别提高了 1.60、0.56 和 1.24 倍。为进一步验证 DNSPE 在组分复杂的复方中应用的可行性, Wang 等^[13]随后将通脉方的主要药效物质葛根素、阿魏酸、丹酚酸 B 和丹参酮 II A 组成组分中药, 采用高压均质法制备了 4 种药效成分共存的纳米混悬液, 作为水相; 将另一药效组分川芎油和 Fabrafil M 1944 C 混合 (9:1, v/v), 作为油相。油水相混合后高压均质, 制得了同时含有通脉方 5 种主要药效成分的 DNSPE。该 DNSPE 中分别有 15.40% 葛根素、15.39% 阿魏酸、10.97% 丹酚酸 B 和 31.51% 丹参酮 II A 吸附于乳滴表面, 形成牢固的吸附膜, 使得该 DNSPE 较纳米晶混悬液和空白乳均具有了更好的物理稳定性。Caco-2 细胞摄取与转运试验显示, 与固体原料药分散液相比, 葛根素的摄取量和肠腔侧 (apical, AP) \rightarrow 基底侧 (basolateral, BL) 的表观渗透系数 (apparent permeability coefficient, P_{app}) 分别提高了 0.66 和 1.21 倍, 丹酚酸 B 分别提高了 0.20 和 0.93 倍, 丹参酮 II A 的摄取量提高了 1.26 倍, AP \rightarrow BL 的 P_{app} 从原料药的无法测得提高至 $5.78 \times 10^{-6} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ ^[14]。DNSPE 还成功应用于丹参、降香组成的复方制剂。笔者^[15]以丹参醇提物 (主要含丹酚酸 B、丹参素、迷迭香酸、丹参酮 II A、隐丹参酮、丹参酮 I 等活性成分) 的纳米晶为水相, 以降香油为油相, 高压均质制得了水包油 (O/W) 型 DNSPE。其中, 丹酚酸 B、丹参素、迷迭香

酸等水溶性成分主要分布于水相,水难溶性的丹参酮类成分部分溶解于降香油中,部分形成纳米晶吸附于降香油滴表面稳定乳液。可见,这种“药辅合一”的DNSPE在成分复杂、各成分性质差异大的中药口服制剂中尤其具有良好的应用前景。

1.2 DNSPE注射给药

相较于口服给药Pickering乳液用于注射给药的研究还较少,主要用于疫苗^[16,17]、免疫佐剂^[18]的递送,给药途径均为皮下注射。目前DNSPE用于注射给药的研究也很少。Zhang等^[19]以中链脂肪酸甘油三酯为油相,制备关节腔注射给药的青藤碱DNSPE。目前青藤碱主要以口服和注射制剂应用于临床,存在口服生物利用度低、生物半衰期较短、胃肠道不良反应大、肝肾损伤和心脏毒性严重等缺陷。与灌胃或关节腔注射青藤碱混悬液相比,关节腔注射DNSPE可显著降低类风湿性关节炎模型大鼠的关节肿胀度、关节炎指数水平和滑膜组织增生,改善脾组织损伤程度,显示出更优的治疗效果和更低的不良反应。同时,DNSPE关节腔注射后还可形成药物贮库,使释药更加平稳。

1.3 DNSPE经皮给药

Carriço等^[20]研制了一款以天然绿色的Quercus Suber Bark (QSB)颗粒为稳定剂的Pickering乳液。研究者将QSB固体微粒先分散于辛酸/癸酸甘油三酯中,再与纯水相高剪切混合,得到了粒径约为90 μm、可稳定至少1个月的乳液。该乳液中仅有油相、纯水和QSB固体微粒,无任何表面活性剂或其他固体物质,被认为是一种Pickering乳液。QSB是由软木脂、木质素、纤维素、少量脂肪酸、萜烯、长链脂肪族化合物、糖类和酚酸构成的轻分子物质,有一定的抗微生物、抗氧化和抗衰老活性。这种以QSB为稳定剂的Pickering乳液是一种剪切稀化流体,无皮肤刺激性,适宜皮肤给

药。QSB赋予该乳液一定的药理效应,如对HaCaT细胞系氧化损伤的保护作用,对中性粒细胞弹性蛋白酶抑制作用。

2 影响DNSPE构建的主要因素

关于DNSPE成型与稳定的研究有待深入。根据目前的研究进展,影响DNSPE成型与稳定的主要因素包括药物纳米晶颗粒的润湿性、粒径、电荷和浓度、制备方法、油水相体积比等。

2.1 药物纳米晶颗粒的润湿性

固体微粒的润湿性对Pickering乳液的类型和稳定性有决定性作用^[21]。微粒的润湿性通常用接触角(θ)表示。 $\theta < 90^\circ$ 的微粒亲水性强,主要浸润在水相,形成O/W型乳液; $\theta > 90^\circ$ 的微粒疏水性强,主要被油相润湿,形成油包水(W/O)型乳液(图1)。

公式(1)表示球形固体微粒在油/水界面形成单层吸附膜后解吸所需的能量。一般而言, θ 在 $30 \sim 150^\circ$ 内时,解吸所需的能量远远超过布朗运动的热能,固体微粒将牢固地吸附在油-水界面,形成稳定的Pickering乳液; θ 越接近 90° ,解吸能就越大,乳液越稳定^[6]。该假设方程适用于完美的球形颗粒。同体积、同材质的非球形微粒具有更大的比表面积,将具有更高的解吸能^[22]。

$$\Delta E = \pi r^2 \gamma_{ow} (1 - |\cos \theta_{ow}|)^2 \quad (1)$$

其中, ΔE 表示解吸能, r 表示球形固体微粒的半径, γ 表示水油的界面张力, θ_{ow} 表示固体微粒的三相接触角。

Tang等^[23]的研究则显示,形成稳定的O/W型乳液的最优接触角是 $70 \sim 86^\circ$,形成W/O型乳液的理想接触角是 $94 \sim 110^\circ$ 。Kaptay等^[24]则认为,单层固体微粒稳定的O/W或W/O型Pickering乳液,理想的接触角范围分别为 $15 \sim 90^\circ$ 和 $90 \sim 165^\circ$;而由多层固体微粒稳

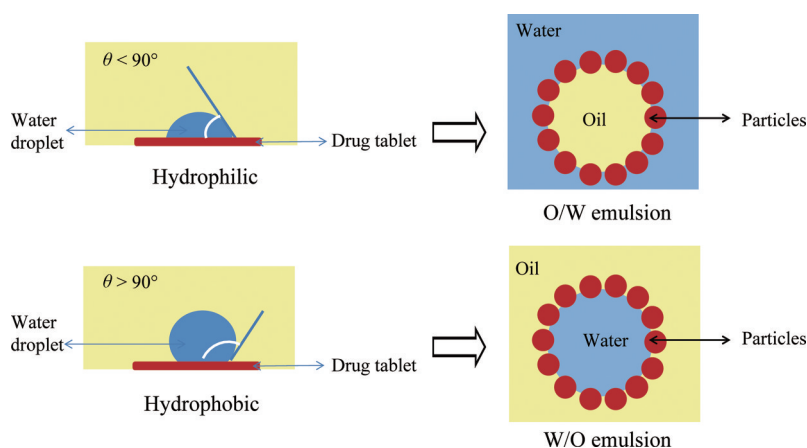


Figure 1 The type of Pickering emulsions as well as the bending behavior of the oil-water interface for drug particles with contact angle less than 90° (above) and greater than 90° (below)

定的 O/W 或 W/O 型 Pickering 乳液, 理想的接触角范围则分别为 15~129.3° 和 50.7~165°。

DNSPE 本质上是一种 Pickering 乳液, 故上述规律可能仍然适用。葛根素在川芎油中的接触角为 82.14°, 在 Labrafil M 1944CS 中接触角为 14.80°, 因此以川芎油为油相制备的葛根素 DNSPE 成乳性和稳定性好, 而以 Labrafil M 1944CS 为油相就无法制备出稳定的乳液^[25]。二氢杨梅素-中链甘油三酯-水的三相接触角为 118.8°, 所以形成 O/W 型 Pickering 乳液^[26]; 熊果酸-菜籽油-水的三相接触角高达 156.4°, 所以更容易形成稳定的 W/O 型乳液^[10]。

需要重视的是, 虽然很多 DNSPE 的研究报道都测定了 θ , 测定方法也都是座滴法, 但具体操作细节却各不相同。有些研究是将药片暴露于空气中, 滴加水测定 θ ^[27]; 有些是将药片浸于油相中平衡一定时间再加水测定 θ ^[26]。前者测定的实际为药物-空气-水的三相接触角, 后者才是药物-油-水的三相接触角。这两种测定方法不仅获得的 θ 大小有差异, 甚至可能呈现不同的亲疏水性。例如阿魏酸在空气-水中的 θ 为 69.5°, 在川芎油-水中的 θ 却为 145°^[28]。有些研究将原料药直接压制成片后测定 θ ^[29], 有些则是将原料药的纳米晶混悬液冷冻干燥后再压片^[9]。不同的药物形态测定的 θ 也存在差异, 如姜黄素原料药测得的空气-水 θ (68°) 显著高于姜黄素无定型纳米颗粒 (59°)^[9]。鉴于冷冻干燥可能改变纳米晶的表面性质, 近年来也有人直接将药物纳米晶混悬液滴于玻片上, 低温干燥, 反复多次使之在玻片上形成一层薄膜, 再测定 θ ^[30]。

不同测定方法对 θ 的测定结果会产生一定影响, 哪种方法测定的结果能更好地阐述润湿性与 DNSPE 乳液类型、稳定性之间的关系, 更符合公式 (1) 的定律? 目前尚未见对此问题的系统研究。现有文献因为各 DNSPE 的油相、纳米晶粒径、制备方法、油水相体积比都不同, 而乳液的类型和稳定性又是这些因素综合作用的结果, 故难以比较分析、探寻规律。这将是 DNSPE 研究的一个方向。

2.2 纳米晶的粒径

固体微粒的粒径是影响 Pickering 乳液形成与稳定的又一关键因素。一般而言, 随着粒径减小, 固体微粒的比表面积增大, 有利于增强其在油水界面的吸附能力。固体颗粒的粒径越小, 在油水界面形成的膜就越致密, 刚性阻隔作用就越强, 越有利于乳滴的稳定。有报道称, 固体微粒的粒径要比乳滴的粒径至少低 1 个数量级才能形成稳定的 Pickering 乳液^[31]。目前用蛋白、纤维素、淀粉等固体微粒稳定的 Pickering 乳液, 固体微粒的粒径多为数百纳米, 乳滴粒径一般在数

微米到数十微米之间^[32,33]。

对于 DNSPE, 纳米晶粒径和 Pickering 乳液的乳滴粒径之间也存在类似关系。水飞蓟宾^[7]、槲皮素^[8]、葛根素^[12]、青藤碱^[19]的 DNSPE 乳滴粒径为纳米晶粒径的 10~80 倍。纳米级的难溶性药物颗粒可能更容易稳定乳液。Wang 等^[34]用不同水相 pH 的葛根素或阿魏酸混悬液以高压均质法制备 DNSPE。结果发现, 葛根素水相 pH 为 5, 阿魏酸水相 pH 为 5 和 7 时, 固体微粒的粒径高达 4~6 μm , 完全无法制备出乳液; 水相 pH 分别提高至 7 和 9 时, 葛根素微粒和阿魏酸微粒的粒径分别降至 300 和 500 nm 左右, DNSPE 的稳定性显著提高, 1 800 $\times g$ 离心 15 min 后仍为乳液状。但是, 不同水相 pH 下的三相接触角并没有显著差异。由此推断, 药物颗粒微米级的粒径是导致不能成乳的重要原因。水相 pH 可能对含有一定酸性或碱性基团的难溶性药物的纳米晶粒径产生影响。芦丁和柚皮苷原料药超声分散于水中后的粒径分别为 180 nm 和 6.41 μm , 制得的 DNSPE 乳滴粒径分别为 22 和 44 μm 。利用微米级的柚皮苷颗粒虽然制得了乳液, 但其稳定性明显低于纳米级的芦丁颗粒制备的乳液。芦丁 DNSPE 放置 14 天后乳滴粒径无显著变化, 而柚皮苷 DNSPE 放置 14 天后乳滴粒径增大了 1 倍^[29]。

但是 DNSPE 乳滴粒径和纳米晶粒径之间的关系可能更加复杂。Wang 等^[35]将粒径为 379.3 nm 的木樨草素纳米晶与松仁油高剪切混合后再高压均质, 制得的 DNSPE 乳滴粒径却反而小于纳米晶粒径, 仅为 125.6 nm。由于该论文没有测定实际吸附于油滴表面的纳米晶粒径, 所以原因还有待进一步研究。

2.3 纳米晶的电荷

固体微粒的 ζ 电位也会影响 DNSPE 的粒径和稳定性。一般而言, 药物纳米晶吸附于乳滴表面后, 会使乳滴带上与纳米晶同性质的电荷。在一定范围内, 纳米晶电荷越多, 乳滴所带电荷可能也就越多, 乳滴之间的静电斥力作用随之增强, 有望更好地阻止乳滴的合并, 提高乳液的稳定性。与此同时纳米晶的电荷越多, 纳米晶之间的斥力增强, 是否会影响纳米晶在乳滴界面的吸附, 目前还没有这方面的研究。Zhang 等^[19]制备了不同 pH 值的青藤碱纳米混悬液, 再加入油相制备青藤碱 DNSPE。当 pH 值为 4 时, ζ 电位为 -20.87 mV, 乳滴粒径为 33.47 μm ; 随着 pH 值逐渐升高至 9, ζ 电位慢慢降至 -32.73 mV, 乳滴之间的电荷斥力作用增强, 乳滴粒径逐渐减小至 17.24 μm 。纳米晶的电荷还可能影响纳米晶的粒径。Luo 等^[36]以黄酮类化合物 Tiliroside 作为稳定剂, 随着水相 pH 值从 2 增加到 8, 纳米晶电荷从 1.8 mV 降低至 -28 mV。纳米晶的电荷又影响了纳

米晶的粒径,随着 ζ 电位的降低,纳米晶粒径先增大后减小: ζ 电位为 -3 mV 时,纳米晶粒径最大,超过 $1\text{ }\mu\text{m}$,随后又逐渐降至 500 nm 以下。在电荷和粒径双重作用下,DNSPE的乳滴粒径也从 $150\text{ }\mu\text{m}$ 减小至约 $30\text{ }\mu\text{m}$ 。目前系统研究纳米晶电荷影响的文献还较少,需要进一步研究。

2.4 纳米晶浓度

DNSPE的成型和稳定机制在于纳米晶在油滴表面的吸附。因此,纳米晶的浓度也是一个重要影响因素,它不仅决定DNSPE是否能形成,也影响乳滴粒径。浓度太小,纳米晶不足以完全覆盖油滴表面,形成的吸附膜的机械阻隔作用就很弱,乳滴容易合并,且粒径较大。Zhang等^[7]研究发现,水飞蓟宾加入量为 100 或 200 mg 时,形成的水飞蓟宾纳米晶较少,只能覆盖油滴的部分表面,乳滴粒径较大,乳液稳定性差。当药物加入量达到 300 mg 时,体系中已有足够量的纳米晶可对油滴形成完全包裹,乳滴粒径减小,乳液稳定性提高。然而,乳滴的总表面积是有限的,因此界面吸附纳米晶的最大量也是有限的。当超过最大界面吸附量后,多余的纳米晶就可能沉淀或形成三维网状凝胶结构。青藤碱纳米晶质量浓度在 $1\sim 5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,随着纳米晶浓度增加,乳液的稳定性增强;继续增大纳米晶质量浓度至 $20\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,界面吸附量达到饱和,多余的药物在静置后沉淀^[19]。鉴于DNSPE中纳米晶在油滴表面的吸附受润湿性、纳米晶粒径、电荷、油滴总表面积等多种因素影响,不同DNSPE适宜的纳米晶质量浓度不尽相同,如姜黄素、槲皮素、葛根素的DNSPE适宜的纳米晶质量浓度分别为 $3\sim 4$ 、 $4\sim 6$ 和 $1\sim 5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ^[8,9,12]。

2.5 制备方法

制备Pickering乳液时固体颗粒的初始分散相会影响乳液成型及其类型。Liu^[37]研究发现,只要将水飞蓟宾先分散于水中,无论是先高压均质制备成纳米晶混悬液,还是直接以微米级的粗分散液为水相,再加入中链脂肪酸甘油酯,经高压均质均可得到O/W型DNSPE。两种方法制得的乳液的乳滴形态和粒径均无明显差异。但如果是先将药物分散于油相,再加入水相进行高压均质,水飞蓟宾则会互相吸附聚集形成不规则的聚集体,无法包裹油滴形成DNSPE。Zhang等^[38]以葛根素为模型药物,以川芎油为油相制备O/W型DNSPE,却得出不同的结果。在葛根素的粗分散液中加入油相混合后高压均质,制得的样品中葛根素吸附于油相,絮凝成团,水油分层明显,完全不成乳。采用水相两步法,即先将葛根素分散于水中,高压均质制备纳米晶混悬液,再加入油相混合后高压均质,或者油相一步法(先将葛根素超声分散于油相,再加水混匀

后高压均质)都可制备出较稳定的葛根素DNSPE。出现这种差异的原因可能与药物的润湿性有关,水飞蓟宾疏水性强,在油相中有较好的溶解度而几乎不溶于水;但葛根素亲水性强,在水相中有一定的溶解度而几乎不溶于油相。这一分析尚需用更多研究验证。

目前O/W型乳液的制备多是将固体微粒初始分散于水相,制备W/O型乳液则是将固体微粒初始分散于油相。除了初始分散相的不同,O/W型DNSPE的制备多是在室温下进行,而W/O型DNSPE制备时往往需要对含固体微粒的油相进行加热,以获得均匀的油相。例如用熊果酸^[10]和薯蓣皂苷元^[27]稳定W/O型Pickering乳液时,都是先将药物微粒分散于油相中, 80 或 $120\text{ }^\circ\text{C}$ 加热使之分散均匀,再加入水相,高剪切混合制备乳液。

另外,还需要考虑乳化方法的影响。Duffus等^[29]比较了高剪切和高压均质对芦丁水合物(强亲水性)和柚皮苷(疏水性)两种黄酮类成分稳定的O/W型DNSPE的影响,发现乳化方法对乳液的粒径和稳定性也有影响。 $10\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 高剪切混合 2 min 制得的柚皮苷乳液粒径接近 $60\text{ }\mu\text{m}$,放置 14 天后粒径增大至 $90\text{ }\mu\text{m}$;高剪切后进一步高压均质,粒径降至约 $0.2\text{ }\mu\text{m}$,放置 14 天后粒径变化不大。可见,高压均质进一步减小了乳滴粒径,提高了乳液的稳定性。这与大部分研究的结果一致。但让人意外的是,高剪切制备的芦丁乳液粒径约为 $10\text{ }\mu\text{m}$, 14 天内粒径变化不大;再经高压均质处理后,粒径反而增大至约 $50\text{ }\mu\text{m}$,放置 14 天粒径又减小至约 $30\text{ }\mu\text{m}$ 。更高能量的高压均质法反而增大了乳滴粒径,其原因可能在于高剪切后的样品进一步高压均质时,已经形成的乳滴破裂,新生成的芦丁微粒粒径较大且分布不均匀,不能再快速吸附于乳滴表面。同时高压均质减小了油滴的粒径,使其比表面积增大,但又没有足够的芦丁微粒吸附,导致小乳滴快速合并,最终形成更大的乳滴^[29]。

2.6 油水体积比

油水体积比是制备Pickering乳液必须考察的工艺因素之一。不同药物的DNSPE适宜的油水体积比往往不一样。水飞蓟宾-中链脂肪酸甘油酯DNSPE的最优油水体积比值为 $1:16$ ^[7],葛根素-川芎油DNSPE的最优油水体积比值为 $1:9$ ^[12],青藤碱-中链脂肪酸甘油三酯DNSPE的最优油水体积比值却是 $4:6$ ^[19]。

DNSPE是基于药物纳米晶在油滴表面形成吸附膜而稳定乳滴,除了油相体积和乳滴粒径会影响吸附的总表面积外,纳米晶的吸附还与纳米晶的粒径、电荷和用量等因素有关。因此在研究DNSPE的成型和稳定时,需要重视油水体积比与其他因素的相互作用。

3 DNSPE 的性质与结构表征方法

3.1 粒径及电位的表征方法

粒径和电位是 DNSPE 的基本性质。目前报道的 ζ 电位的测定方法较一致,均是采用仪器直接测定。粒径的测定方法则主要有两种:一是基于动态光散射技术用激光粒度分析仪测定,获得 $d_{4,3}$ 、 $d_{3,2}$ 、 $d_{0,5}$ 等粒径参数;二是用光学显微镜拍摄乳滴图片,用软件分析数百个(如200或300)乳滴的粒径后按照公式(2)计算平均粒径或 $d_{4,3}$ 、 $d_{3,2}$ ^[8,10]。

$$d_{4,3} = \frac{\sum d_i^4}{\sum d_i^3} \quad d_{3,2} = \frac{\sum n_i d_i^3}{\sum n_i d_i^2} \quad (2)$$

方法一可能将未吸附于乳滴表面的游离纳米晶一并纳入测定范围,因此若要获得更准确的乳滴粒径,则需要分离游离的纳米晶。但在不影响乳滴稳定性的前提下很难分离游离的纳米晶,所以大多文献在测定乳滴粒径时没有分离游离的纳米晶。方法二则受拍摄的乳滴图片和人为计数的主观影响较大。两种方法测定同一样品的粒径是否有差异,尚无比较研究。此外,粒径测定时样品稀释是否会对测定结果产生影响也有待研究。

3.2 稳定性的评价方法

稳定性是 DNSPE 性质评价的关键指标之一。目前稳定性评价常用的方法有3种。①放置一定时间后乳滴粒径的变化。②测定 creaming stability (水层的高度/乳液的初始总高度 $\times 100\%$ ^[29])或 coalescence% (析出的油相高度/乳液的初始总高度^[9]),即将乳液置于小瓶中放置一定时间,不稳定的乳液将出现分层现象。以上两者计算方法虽不一样,但实质上都是评价乳液放置后油或水分层的情况。油层或水层体积越大,乳液稳定性越差。这两种评价方法被广泛使用,但有一定缺陷。对于油相析出很少,如仅有零星油相析出的样品,难以准确定量油层的体积。对于水层到乳层呈逐渐变化而无明显分界线的样品,也难以准确确定明亮的水层。③离心法评价乳液的稳定性。该法因快捷、操作简便也被广泛用于 DNSPE 的稳定性评价,但目前尚无统一的离心条件。葛根素 DNSPE 的研究参照《中

国药典》(2020版)乳液稳定性研究,选用了 $1\,800 \times g$ 离心 15 min ^[12],薯蓣皂苷元稳定 DNSPE 的研究采用了 $5\,000 \times g$ 离心 5 min ^[27],木犀草素 DNSPE 的稳定性考察选用 $11\,180 \times g$ 离心 10 min ^[35]。对离心后的样品,有的研究是测定油相或水相的析出体积^[27,35],有的是通过测定乳层样品在 500 nm 的吸光度值评价乳液浊度变化^[12]。离心后越是清亮的乳液,吸光度值越小,稳定性越差。

3.3 界面吸附的表征方法

观察药物纳米晶在乳滴油水界面的吸附是确定 DNSPE 微观结构必不可少的表征手段。

3.3.1 扫描电镜 (scanning electron microscope, SEM)

和冷冻扫描电镜 (Cryo-SEM) SEM 是观察乳滴表面微观结构的常用方法。将 DNSPE 分散于硅胶膜或锡箔纸、聚碳酸酯膜等载体材料表面,自然挥干,经喷金处理后就可利用 SEM 观察。通过与空白乳滴比较,判断乳滴表面是否有纳米晶吸附。Zhang 等^[7]率先用这种方法证实了水飞蓟宾纳米晶在 DNSPE 乳滴表面的吸附。DNSPE 挥干乳滴的表面不平整,有大量明显突起,即大量纳米尺寸的药物纳米晶,形成外壳(图2)。

常规扫描电镜的样品室为高真空环境,要求观察的样品干燥无挥发,因此需先将乳液干燥后才能进行观察。但干燥过程中乳滴结构可能会发生变化,致使无法观察其真实结构和大小。Cryo-SEM 可利用超低温冷冻制样及传输技术,直接观察液体、半液体样品。样品经过超低温冷冻(低至 $-140 \text{ }^\circ\text{C}$)、断裂、镀膜制样(喷金/喷碳)等处理后,通过冷冻传输系统放入电镜内的冷台(温度可至 $-180 \text{ }^\circ\text{C}$)即可进行观察。该技术已被用于 DNSPE 的结构观察^[9,29]。

3.3.2 荧光倒置显微镜 (fluorescent inverted microscope, FIM)

对于自身带有荧光的难溶性药物,如葛根素、姜黄素,可直接用荧光显微镜观察吸附于乳滴表面的药物纳米晶。笔者^[12]用这种方法研究葛根素 DNSPE 的乳滴结构时,在乳滴表面观察到一圈明显的葛根素的黄绿色荧光(图3),证实了葛根素纳米晶在乳

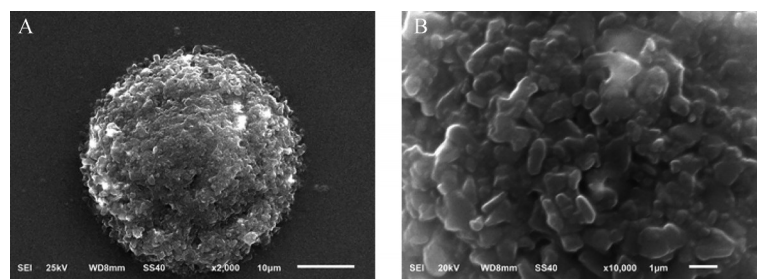


Figure 2 Scanning electron micrographs of silybin DNSPE (A) and its surface structure (B)^[7]. DNSPE: Drug nanocrystals self-stabilized Pickering emulsion

滴界面的吸附。

3.3.3 激光共聚焦显微镜 (confocal laser scanning microscope, CLSM) 因为CLSM的放大倍数远高于FIM, CLSM在DNSPE的结构表征中更常用, 能清晰观察到纳米晶在油滴表面的吸附 (图4)^[39]。

CLSM可用于自身有荧光的难溶性药物 (如木犀草素、芦丁、柚皮苷、姜黄素、槲皮素等) DNSPE的直接观察。对于自身没有荧光的难溶性药物, 则可通过化学反应使药物带上荧光后再观察。银杏叶提取物中含有大量黄酮成分, 与 AlCl_3 可发生化学反应生成有荧光的物质。Yang等^[40]基于这一原理, 将银杏叶黄酮稳定的DNSPE与等体积的 AlCl_3 乙醇溶液混合, 再用CLSM在488 nm激发波长下观察乳滴结构。Tween20稳定的乳液中没有观察到红色荧光, 而银杏黄酮稳定的乳液中观察到红色的黄酮物质既分散于水相中, 也吸附于油滴表面, 证实了该Pickering乳液的乳滴结构。

荧光标记法也是常用方法。例如乳液的油相用尼罗红标记, 水相用尼罗蓝标记, 分别在488和633 nm观察油相中的尼罗红和固体微粒上的尼罗蓝荧光, 二者图像用软件拼合, 即可观察到尼罗红染色的油滴表面有固体微粒的吸附。具体操作方面, 有的研究是先分别将尼罗红和尼罗蓝溶解于油相和水相, 再制备DNSPE^[27]; 也有研究是观察前在制备好的乳液中加入0.01%的尼罗红丙二醇溶液和0.1%尼罗蓝水溶液进行染色^[26]。但是, 严格来说, 尼罗蓝分散于水中后CLSM观察到的实际是尼罗蓝在油滴界面的吸附。欲用该方法来验证药物纳米晶吸附于油滴表面, 必须先证实尼罗蓝能和纳米晶结合在一起, 且除去未吸附的游离尼罗蓝, 尼罗蓝的荧光才能代表纳米晶而不是游离的尼罗蓝染料自身。遗憾的是, 目前尚无文献提供这一证据。

3.3.4 药物分布和吸附率的测定方法 药物纳米晶混悬液与油相混合后, 部分药物溶解于油相, 而纳米晶除了吸附于油滴表面外, 也可能游离分散于水相中。药物的不同状态及分散相对其进入机体后的命运及药效可能产生重大影响。因此有必要研究药物在DNSPE中的分布, 测定纳米晶的界面吸附率。目前测定界面

吸附率的主要研究方法有: ① 测定未吸附的游离药物量。Luo等^[36]将芦丁、柚皮苷等黄酮微粒稳定的正己烷乳液于4 000 ×g离心20 min, 分离水相, 测定未吸附的游离黄酮化合物的浓度。这种方法可在药物总浓度相同的情况下, 比较各DNSPE中药物纳米晶的吸附情况。② 测定药物的相分布。该法需先破坏纳米晶在乳滴表面的吸附, 将乳液分离为水相、油相和吸附层, 再分别测定各相的药物浓度。Wang^[34]用此方法比较了葛根素、丹参酮IIA DNSPE中药物的分布及吸附情况。将新制备的DNSPE于1 800 ×g离心15 min获得稳定的乳液后, 测定乳液层的药物总量。将离心后的乳液再于4 °C、50 000 r·min⁻¹离心1 h, 样品分离为油相 (上层)、清亮的水相 (下层) 和吸附的药物层 (油水界面中间层), 小心分离各层, 测定油、水相体积和药物含量, 计算药物在各相中的分布率。结果显示, 葛根素DNSPE中葛根素70.3%溶解于水相, 29.3%以纳米晶形式吸附于乳滴表面, 葛根素几乎不溶于川芎油, 故油相中的葛根素含量不足1%。丹参酮IIA在油相中的溶解性好而几乎不溶于水, 故有近26%的丹参酮IIA分布于油相, 有近74%吸附于乳滴界面。该法能获得药物在DNSPE中的分布情况, 有利于理解DNSPE的微观结构。③ 测定乳滴表面覆盖率。该法是测定单位面积乳滴表面所吸附的药物纳米晶量。Yang等^[40]将银杏叶提取物稳定的Pickering乳液于4 °C、12 000 ×g离心30 min, 用注射器小心收集底部透明的水层, 冷冻干燥后测定冻干粉中黄酮物质的总量, 按公式(3)计算出银杏黄酮化合物的表面覆盖率为 $40.01 \pm 1.13 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$ 。

$$\begin{aligned} \Gamma &= (C_{\text{adsorbed}} \times d_{3,2}) / (\varphi \times 6) \\ &= [(C_{\text{emulsion}} - C_{\text{sublayer}}) \times d_{3,2}] / (\varphi \times 6) \end{aligned} \quad (3)$$

其中, Γ ($\text{mg} \cdot \text{m}^{-2}$) 表面的黄酮浓度, C_{adsorbed} 、 C_{emulsion} 和 C_{sublayer} ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 分别是离心后各相层中黄酮类成分的质量浓度, $d_{3,2}$ (mm) 是乳滴的比表面平均粒径, φ 表示乳液中油相的比例。

然而, 此方法不能表征纳米晶对乳滴表面的覆盖程度, 即有多大比例的乳滴表面被固体微粒覆盖。

由上可见, 目前DNSPE中药物分布的研究方法都

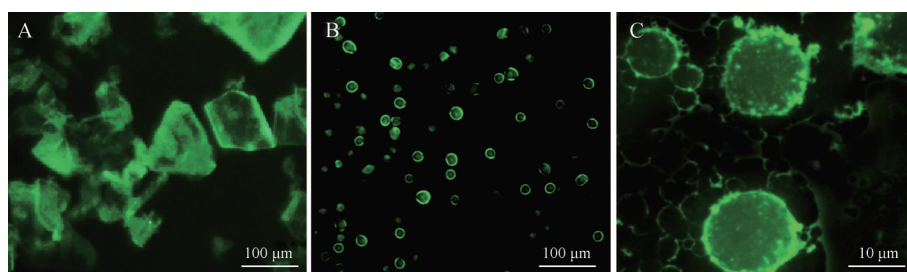


Figure 3 Fluorescence micrographics of crude material (A), puerarin DNSPE (B, C)^[12]. Adapted from Ref. 12 with permission. Copyright © 2018 MDPI

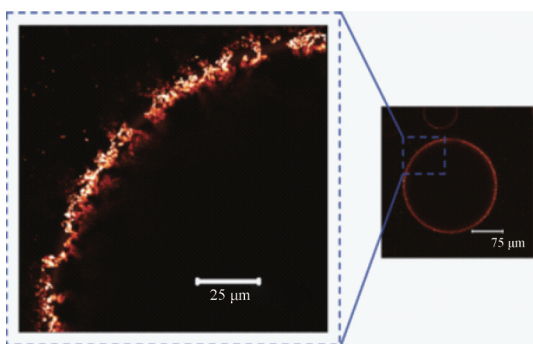


Figure 4 CLSM images of fine 20 vol % n-tetradecane emulsions prepared *via* vortexing in the presence of $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ tiliroside^[39]. The brightness in the images is caused by autofluorescence of the flavonoid particles themselves. Adapted from Ref. 39 with permission. Copyright © 2011 American Chemical Society

是先将乳液高速离心实现相分离,再测定各相中的药物含量,其关键在于油相的分离和体积测定。但是,因为多数 DNSPE 的油相含量较小,离心后体积往往较少,分离困难,测定的体积偏差也较大,影响吸附率的测定结果,尤其是对于油相中溶解度较大的药物,该方法的准确度更有待商榷。同时,就某一 DNSPE 而言,离心速度和时间也需要优选。如何区分游离于水相中的纳米晶和吸附于乳滴表面的纳米晶,更是该方法面临的一个难题。

4 DNSPE 的体内命运

作为一种载药系统, DNSPE 进入人体后的命运与其药效密切相关。目前关于 Pickering 乳液体内命运的研究多集中于食品领域。以蛋白、淀粉、纤维素等为稳定剂,以大豆油、葵花籽油、花生油等植物油为油相,将这些 Pickering 乳液依次与模拟的人工唾液、胃液、小肠液混合孵育一定时间,观察粒径和电位、乳滴结构的变化,游离脂肪酸和溶解于油相中的药物(如葫芦毒素^[41]、葛根素^[42]、维生素 D₃^[43])的释放动力学或生物有效性,以考察 Pickering 乳液口服后的结构变化和油相中药物的释放与利用。与普通 Pickering 乳液一样,口服 DNSPE 的体内命运研究首先注重其在胃肠液内的变化,尤其是活性药物纳米晶在体内的变化和吸收、分布等。目前这方面的研究有 DNSPE 在模拟胃肠液中的稳定性、在体肠吸收和 Caco-2 细胞模型研究。

Wang 等^[35]考察了木犀草素稳定的松仁油 Pickering 乳液在模拟胃肠液中的稳定性。将乳液逐滴加入到模拟胃液和模拟肠液中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下分别搅拌 2 和 6 h, 测定粒径和 ζ 电位的变化。结果显示,在胃肠液环境中少量木犀草素可能从乳滴表面脱落下来,导致粒径和电位都略有所增加,但变化幅度并不大,乳液的相对浊度也在 90% 以上,说明该 DNPSE 在胃肠液中具有较好的

稳定性。

葛根素 DNSPE 却展现出不同的胃液稳定性。Wang^[44]将葛根素 DNSPE 先与模拟胃液以一定比例混合孵育 1 h, 再调节 pH 为 7.5, 加入胆汁提取物和胰酶, 模拟小肠环境继续孵育一定时间。结果发现, DNSPE 与模拟胃液混合后样品变清亮, 且时间越长、模拟胃液越多, 清亮现象越明显; DNSPE 与模拟胃液接触后, 乳滴粒径减小, 荧光显微镜观察到乳滴表面的葛根素绿色荧光圈变弱, 说明模拟胃液对 DNSPE 的乳滴结构可能有一定的破坏。而模拟胃液对表面活性剂稳定的普通乳的影响则较弱: 外观仅略变清亮, 乳滴的粒径和形态均无明显变化。在模拟肠液中, DNSPE 的变化和普通乳变化相似。模拟肠液中孵育 2 h 后, 除观察到球状的乳滴外, 两种乳液都观察到大量粒径约为 $0.5\sim 1\text{ }\mu\text{m}$ 的药物结晶。

DNSPE 口服后胃肠道吸收部位的影响研究可以采用大鼠单向肠灌流实验。例如, 葛根素 DNSPE 的吸收速率常数和表观渗透系数值按十二指肠、空肠、回肠和结肠段的顺序依次递减, 其中十二指肠显著高于空肠和回肠 ($P < 0.05$), 极显著高于结肠 ($P < 0.01$), 空肠和回肠间没有显著性差异^[45]。这种差异可能与什么有关? 是不同肠段的 pH 值还是葛根素自身的性质? 这与普通乳液或者葛根素原料药的吸收部位是否相同? 遗憾的是这些问题尚未见后续研究报道。

DNSPE 的跨膜吸收机制采用 Caco-2 细胞模型进行了初步研究。DNSPE 中葛根素跨 Caco-2 细胞单层模型的转运同时存在被动转运和主动转运两种机制。细胞摄取过程存在小窝蛋白介导的内吞, 网格蛋白介导的内吞和巨胞饮这两种吸收方式作用则很少^[46]。通脉方组中药 DNSPE 的研究也证实了这一机制。该 DNSPE 的药效成分葛根素、阿魏酸、藜本内酯(川芎油最主要的成分)和丹参酮 IIA 的摄取量较纳米晶混悬液/油的物理混合物均明显增加, 证实 DNSPE 对难溶性、低渗透性和挥发性的各组分均具有一定的促吸收效果, 各成分的细胞转运机制主要是被动扩散和小窝蛋白介导的内吞^[14]。由此提出假说: 药物纳米晶吸附于微米粒径的油滴表面形成“微”“纳”协同的微观结构是促进各成分的细胞摄取和转运的关键因素。

Zhang 等^[19]研究分析关节腔注射剂青藤碱 DNSPE 的药效优于青藤碱原料药组的原因: 相比于青藤碱原料药, 药物在 DNSPE 中以纳米形态存在, 更有利于药物的吸收, 从而增加了药物利用度。同时青藤碱溶解于 DNSPE 的油相中, 形成药物贮库效应, 使药物在关节腔内缓慢释放并增加驻留时间, 也提高了药物利用率。

5 研究展望

作为一种独特的新型 Pickering 乳液, DNSPE 已在药物递送领域显示出良好的应用前景,但是有关基础研究和应用研究都还有待加强。

目前迫切需要研究的基础问题有: 构建制备方面, 如何准确测定难溶性药物纳米晶而非原料药在油水界面的三相接触角, 进而准确揭示纳米晶的三相接触角对乳液构建的影响? 如何优化纳米晶的粒径和电荷, 以更有利于纳米晶在乳滴表面的吸附? 纳米晶粒径和乳滴粒径之间有何关系, 这一关系是否又受药物本身和油相的性质的影响? 此外, 纳米晶的不同形状, 如球形、长柱状、片状等, 会对 DNSPE 的构建和性质产生怎样的影响? 受界面吸附饱和现象的限制, DNSPE 的载药量仍有限, 是否有可能开发一种含游离纳米晶的过饱和 DNPSE, 以提高载药量? 结构表征方面, 如何准确区分游离于连续相中的纳米晶和吸附于乳滴表面的纳米晶, 准确定量药物在 DNSPE 各相中的分布? 如何表征乳滴表面被纳米晶覆盖的程度? 多种纳米晶共存时如何区别研究各纳米晶在乳滴界面的吸附行为?

在药学研究方面, DNSPE 目前的质量标准不完善, 稳定性实验的方法和条件都各不相同, 不符合新药开发的要求。目前报道的 DNSPE 都是实验室规模制备, 工艺放大后如何确保纳米晶的粒径、在乳滴界面的吸附率仍保持小试时的良好状态? DNSPE 是以乳液形式给药或是可将其固体化后再制备成胶囊甚至片剂? 目前已有采用喷雾干燥^[47]或冷冻干燥^[48]将 DNSPE 固体化的报道, 但干燥过程对 DNSPE 的影响, 尤其是对体内行为和药效的影响, 尚未见研究。这些都是将 DNSPE 开发成新药必须解决的关键问题。

体内命运是 DNSPE 系统最引人关注的方面, 也是目前研究最薄弱的方面。目前研究多是口服药动力学或肠道吸收研究。不同的给药途径, 如静注、皮下、口服等给药后, DNSPE 在不同的生理环境下的变化, 如纳米晶是否会从乳滴表面解吸下来, 能在多长时间内维持完整的乳滴结构, 解吸的纳米晶形态、粒径、电荷等性质会有何种变化? 分散于连续相中的纳米晶、吸附于乳滴表面的纳米晶、溶解于非连续相中的纳米晶各自如何被吸收, 吸收速率和机制是否一样, 何种状态的药物能达到更好的治疗效果和更小的毒副作用? 这些与临床应用相关的问题, 是开发高效低毒的 DNSPE 给药系统的关键。

上述 DNSPE 体内外研究的难点和关键在于如何准确追踪体内外药物纳米晶的变化状态, 尤其是将其与溶解的药物分子区别开来。近年来环境响应型荧光探针杂合技术可基于探针在不同环境下的荧光淬灭现

象有效区分纳米晶体和游离药物, 已成功用于药物纳米晶的体内外命运研究^[49]。P2、P4 是一类具有聚集诱导淬灭 (aggregation-caused quenching, ACQ) 的荧光探针。当其以分子形式杂合在纳米晶中时发射荧光; 当纳米晶溶解探针被释放出来, 遇水迅速聚集导致荧光完全淬灭。Shen 等^[50]和 Wang 等^[51]分别将 P2 探针杂化到槲皮素或姜黄纳米晶中, 结合活体成像技术观察了药物纳米晶静注后在体内的分布和消除。四苯乙烯 (tetraphenylethene, TPE)、四-(4-羟基苯) 乙烯 (tetrakis(4-hydroxyphenyl) ethylene, THPE) 是一类具有聚集诱导发光效应 (aggregation-induced emission, AIE) 的荧光探针, 当其杂合于纳米晶中时, 分子运动被限定, 发射出荧光; 纳米晶溶解后探针被释放出来溶解于水中, 分子可自由运动, 荧光淬灭。Wang 等^[52]将 TPE 杂化到紫杉醇纳米晶中, 证实紫杉醇能以完整的纳米晶形式被 HT-29 和 KB 细胞摄取。Zhang 等^[53]进一步研究了 THPE 纳米晶的晶体形式和分子形式被 KB 细胞摄取和外排的分子动力学过程。这些研究可为 DNSPE 体外结构和体内命运探索提供借鉴。

作为一种新型 Pickering 乳液, 近几年来 DNSPE 因不含表面活性剂或异相固体微粒稳定剂、减少辅料带来的安全隐患、载药量高、稳定性好、显著提高生物利用度等优点吸引了越来越多的关注。相信随着对以上关键基础理论和应用问题的深入研究, DNSPE 在难溶性药物新型给药系统方面的发展将越来越快, 临床应用也将越来越多。

作者贡献: 董芳明、刘川负责查阅文献并将按综述框架分类整理文献素材; 张继芬负责初稿写作; 易涛负责论文修改。

利益冲突: 本文所有作者声明不存在利益冲突关系。

References

- [1] Liang L, Zhu JL, Zhang ZY, et al. Pickering emulsion stabilized by tea seed cake protein nanoparticles as lutein carrier [J]. *Foods*, 2022, 11: 1712.
- [2] Lam S, Velikov KP, Velev OD. Pickering stabilization of foams and emulsions with particles of biological origin [J]. *Curr Opin Colloid Interface Sci*, 2014, 19: 490-500.
- [3] Ming LS, Wu HL, Liu A, et al. Evolution and critical roles of particle properties in Pickering emulsion: a review [J]. *J Mol Liq*, 2023, 388: 122775.
- [4] Mwangi WW, Lim HP, Low LE, et al. Food-grade Pickering emulsions for encapsulation and delivery of bioactives [J]. *Trends Food Sci Technol*, 2020, 100: 320-332.
- [5] Yang D, Feng YQ, Yao XL, et al. Recent advances in bioactive nanocrystal-stabilized Pickering emulsions: fabrication, charac-

- terization, and biological assessment [J]. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 2023, 22: 946-970.
- [6] Tai ZG, Huang YP, Zhu QG, et al. Utility of Pickering emulsions in improved oral drug delivery [J]. *Drug Discov Today*, 2020, 25: 2038-2045.
- [7] Zhang JF, Liu C, Zhang J, et al. Preparation and evaluation of silybin nanocrystallines self-stabilizing Pickering emulsion [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2016, 51: 813-820.
- [8] Wang Z, Dai B, Tang XH, et al. Fabrication and *in vitro/vivo* evaluation of drug nanocrystals self-stabilized Pickering emulsion for oral delivery of quercetin [J]. *Pharmaceutics*, 2022, 14: 897.
- [9] Aditya NP, Hamilton IE, Norton IT. Amorphous nano-curcumin stabilized oil in water emulsion: physico chemical characterization [J]. *Food Chem*, 2017, 224: 191-200.
- [10] Liu YG, Xia HP, Guo SY, et al. Development and characterization of a novel naturally occurring pentacyclic triterpene self-stabilized Pickering emulsion [J]. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*, 2022, 634: 127908.
- [11] Hu HQ, Cheng GW, Wu YF, et al. Conversion of traditional Chinese medicine (TCM) into nanomedicine: application of theory of unification of medicines and excipients [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2023, 48: 1800-1807.
- [12] Zhang JF, Zhang J, Wang SA, et al. Development of an oral compound Pickering emulsion composed of nanocrystals of poorly soluble ingredient and volatile oils from traditional Chinese medicine [J]. *Pharmaceutics*, 2018, 10: 170.
- [13] Wang YH. Exploration The Application of New Oral Drug Formulation of Nanocrystals Self-stabilized Pickering Emulsions in Component-based Chinese Medicine of Tongmai Recipe (口服新剂型药物纳米晶自稳定 Pickering 乳用于通脉方组分中药的探索) [D]. Chongqing: Southwest University, 2021.
- [14] Zhang JF, Ye X, Wang YH, et al. Nanocrystal self-stabilized Pickering emulsion loaded with active components of Tongmai prescription: preparation, characterization and evaluation by Caco-2 cell model [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2023, 58: 208-216.
- [15] Zhang JF, Xu XY, Zhang J, et al. A *Salvia miltiorrhiza* extract nanocrystals self-stabilized Pickering emulsion and its preparation method: CN, ZL 201910411261.5 [P]. 2021-07-09.
- [16] Du YQ, Song TT, Wu J, et al. Engineering mannosylated Pickering emulsions for the targeted delivery of multicomponent vaccines [J]. *Biomaterials*, 2022, 280: 121313.
- [17] Zhang Y, Gu PF, Jiao LN, et al. Chinese yam polysaccharides PLGA-stabilized Pickering emulsion as an adjuvant system for PCV-2 vaccine to enhance immune response [J]. *Int J Biol Macromol*, 2022, 219: 1034-1046.
- [18] Jiao LN, Liu ZG, Zhang Y, et al. Lentinan PLGA-stabilized Pickering emulsion for the enhanced vaccination [J]. *Int J Pharm*, 2022, 611: 121348.
- [19] Zhang JH, Liang X, Bai HT, et al. Pharmacodynamic and pharmacodynamics of sinomenine nanocrystals self-stabilized Pickering emulsions injected into articular cavity [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2022, 53: 6412-6422.
- [20] Carriço C, Pinto P, Graça A, et al. Design and characterization of a new quercus suber-based Pickering emulsion for topical application [J]. *Pharmaceutics*, 2019, 11: 131.
- [21] Xia T, Xue CH, Wei ZH. Physicochemical characteristics, applications and research trends of edible Pickering emulsions [J]. *Trends Food Sci Technol*, 2021, 107: 1-15.
- [22] Zembyla M, Murray BS, Sarkar A. Water-in-oil Pickering emulsions stabilized by water-insoluble polyphenol crystals [J]. *Langmuir*, 2018, 34: 10001-10011.
- [23] Tang JT, Quinlan PJ, Tam KC. Stimuli-responsive Pickering emulsions: recent advances and potential applications [J]. *Soft Matter*, 2015, 11: 3512-3529.
- [24] Kaptay G. On the equation of the maximum capillary pressure induced by solid particles to stabilize emulsions and foams and on the emulsion stability diagrams [J]. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*, 2006, 282: 387-401.
- [25] Zhang J. Study on Feasibility of Puerarin Nanocrystalline Self-stabilized Pickering Emulsion (葛根素纳米晶自稳定 Pickering 乳液的研究) [D]. Chongqing: Southwest University, 2017.
- [26] Geng S, Jiang ZJ, Ma HJ, et al. Fabrication and characterization of novel edible Pickering emulsion gels stabilized by dihydro-myricetin [J]. *Food Chem*, 2021, 343: 128486.
- [27] Wan Z, Xia HP, Guo SY, et al. Water-in-oil Pickering emulsions stabilized solely by a naturally occurring steroidal sapogenin: diosgenin [J]. *Food Res Int*, 2021, 147: 110573.
- [28] Wang F, Wang S, Yi T, et al. Effects of drug-oil properties on fabrication of drug nanocrystalline self-stabilized Pickering emulsions [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2017, 42: 3739-3746.
- [29] Duffus LJ, Norton JE, Smith P, et al. A comparative study on the capacity of a range of food-grade particles to form stable O/W and W/O Pickering emulsions [J]. *J Colloid Interface Sci*, 2016, 473: 9-21.
- [30] Ataiean P, Nasserri R, Tong A, et al. Effect of oil phase transition on the stability of Pickering emulsions stabilized by cellulose nanocrystals [J]. *Langmuir*, 2022, 38: 2737-2745.
- [31] Xiao J, Li YQ, Huang QR. Recent advances on food-grade particles stabilized Pickering emulsions: fabrication, characterization and research trends [J]. *Trends Food Sci Technol*, 2016, 55: 48-60.
- [32] Xiong YT, Chen Y, Yi XZ, et al. Effect of four plant oils on the stability of high internal phase Pickering emulsions stabilized by ovalbumin-tannic acid complex [J]. *Int J Biol Macromol*, 2022, 222: 1633-1641.
- [33] Guo BZ, Liu CM, Grossmann L, et al. Pickering emulsion stabilized by hydrolyzed starch: effect of the molecular weight

- [J]. *J Colloid Interface Sci*, 2022, 612: 525-535.
- [34] Wang F. Studies on the Factors Influencing the Fabrication of Three Insoluble Components of Tongmai Formula Drug Nanocrystals Self-stabilized Pickering Emulsions (影响通脉方中三种难溶性成分纳米晶自稳定Pickering乳液制备的因素研究) [D]. Chongqing: Southwest University, 2019.
- [35] Wang L, Lu SM, Deng YP, et al. Pickering emulsions stabilized by luteolin micro-nano particles to improve the oxidative stability of pine nut oil [J]. *J Sci Food Agric*, 2021, 101: 1314-1322.
- [36] Luo ZJ, Murray BS, Ross AL, et al. Effects of pH on the ability of flavonoids to act as Pickering emulsion stabilizers [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2012, 92: 84-90.
- [37] Liu C. Study on Two Novel Pickering Emulsion-Based Drug Delivery Systems of Poorly Water-soluble Active Components from Traditional Chinese Medicines (基于Pickering乳液的中药难溶性有效成分的新型给药系统研究) [D]. Chongqing: Southwest University, 2014.
- [38] Zhang J, Wang F, Wang JR, et al. Study on feasibility of puerarin nanocrystalline self-stabilized Pickering emulsion [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2017, 48: 75-84.
- [39] Luo ZJ, Murray BS, Yusoff A, et al. Particle-stabilizing effects of flavonoids at the oil-water interface [J]. *J Agric Food Chem*, 2011, 59: 2636-2645.
- [40] Yang D, Wang XY, Ji CM, et al. Influence of *Ginkgo biloba* extracts and of their flavonoid glycosides fraction on the *in vitro* digestibility of emulsion systems [J]. *Food Hydrocoll*, 2014, 42: 196-203.
- [41] Yi J, Gan C, Wen Z, et al. Development of pea protein and high methoxyl pectin colloidal particles stabilized high internal phase Pickering emulsions for beta-carotene protection and delivery [J]. *Food Hydrocoll*, 2021, 113: 106497.
- [42] Li RR, Yuan GB, Li DH, et al. Enhancing the bioaccessibility of puerarin through the collaboration of high internal phase Pickering emulsions with beta-carotene [J]. *Food Funct*, 2022, 13: 2534-2544.
- [43] Torlopov MA, Vaseneva IN, Mikhaylov VI, et al. Surface, rheopexy, digestive stability and toxicity of olive oil emulsions stabilized by chitin nanocrystals for vitamin D3 delivery [J]. *Carbohydr Polym*, 2022, 284: 119162.
- [44] Wang S. Oral Absorption Mechanism of Puerarin Nanocrystals Self-stabilized Pickering Emulsion (葛根素纳米晶自稳定Pickering乳液口服吸收机制的初步探索) [D]. Chongqing: Southwest University, 2019.
- [45] Wang S, Li QQ, Wang F, et al. Intestinal absorption of puerarin nanocrystalline self-stabilizing Pickering emulsion in rats [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2018, 43: 2162-2167.
- [46] Wang YH, Ye X, Meng FJ, et al. Study on oral absorption mechanisms of puerarin in nanocrystals self-stabilized Pickering emulsion [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2021, 46: 2051-2060.
- [47] Zhang JF, Wang YH, Wang JR, et al. A novel solid nanocrystals self-stabilized Pickering emulsion prepared by spray-drying with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin as carriers [J]. *Molecules*, 2021, 26: 1809.
- [48] Zhang JF. A freeze dried Pickering emulsion of puerarin and its preparation method: CN, ZL2019 0568549.3 [P]. 2020-06-30.
- [49] Lu Y, Qi JP, Dong XC, et al. The *in vivo* fate of nanocrystals [J]. *Drug Discov Today*, 2017, 22: 744-750.
- [50] Shen BD, Shen CY, Zhu WF, et al. The contribution of absorption of integral nanocrystals to enhancement of oral bioavailability of quercetin [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11: 978-988.
- [51] Wang T, Qi JP, Ding N, et al. Tracking translocation of self-discriminating curcumin hybrid nanocrystals following intravenous delivery [J]. *Int J Pharm*, 2018, 546: 10-19.
- [52] Wang J, Lv FM, Wang DL, et al. Synergistic antitumor effects on drug-resistant breast cancer of paclitaxel/lapatinib composite nanocrystals [J]. *Molecules*, 2020, 25: 604.
- [53] Zhang JF, Corpstein CD, Li TL. Intracellular uptake of nanocrystals: probing with aggregation-induced emission of fluorescence and kinetic modeling [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11: 1021-1029.