

## 肉桂酸改性透明质酸颗粒乳化剂的制备及性能

洪 慧, 诸 超, 冉海燕, 邱 野, 吴瑞雪, 朱 叶\*, 罗 静, 刘晓亚

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

**摘 要:** 将具有紫外吸收性能的单体肉桂酸 (CA) 引入天然大分子透明质酸 (HA) 中, 制得疏水性 HA-CA, 并在 H<sub>2</sub>O/DMSO 中自组装制备 HA-CA 胶体粒子, 并以之为颗粒乳化剂稳定油水界面, 制备 Pickering 乳液。通过紫外、核磁、纳米粒度仪、透射电镜、光学显微镜等仪器对 HA-CA、HA-CA 胶体粒子及其所稳定的乳液进行表征。结果表明, HA-CA 可以在选择性溶剂中自组装形成粒径约为 95 nm 的球形胶体粒子; 所得的 HA-CA 胶体粒子可以有效的稳定油水界面, 制备 O/W 型的 Pickering 乳液, 且所得乳液具有良好的耐盐性和细胞相容性; 此外该胶体粒子可稳定多种油-水体系, 具有一定普适性。

**关键词:** 透明质酸; 肉桂酸; 光敏双亲大分子; 自组装胶体粒子; 颗粒乳化剂

**中图分类号:** O636.9; Q539.7

**文献标志码:** A

## Preparation and Performance of Particulate Emulsifier Self-assembled from Cinnamic Acid Modified Hyaluronic Acid

HONG Hui, ZHU Chao, RAN Hai-yan, QIU Ye, WU Rui-xue, ZHU Ye\*, LUO Jing, LIU Xiao-ya

(Key Laboratory of Food Colloids and Biotechnology of Ministry of Education, School of Chemical and Material Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China)

**Abstract:** The photosensitive monomer cinnamic acid (CA) was introduced into hyaluronic acid (HA) to prepare amphiphilic HA-CA. HA-CA colloidal particles were obtained through self-assembly in selective solvents H<sub>2</sub>O/DMSO. The structure and the modification degree of HA-CA were confirmed by ultraviolet spectroscopy (UV) and proton nuclear magnetic resonance (<sup>1</sup>H-NMR). The self-assembly behavior of HA-CA were investigated. The size and morphology of the HA-CA colloidal particles were characterized by transmission electron microscopy (TEM), dynamic light scattering (DLS) and Zeta potential analyzers. The HA-CA colloidal particles were used as particulate emulsifier to stabilize oil-water interface and the emulsification performance of HA-CA colloidal particles in different condition such as pH value, salt concentration and the oil type were investigated. The morphology of colloidal particles in oil-water interface was observed by styrene oil phase solidification method.

收稿日期: 2018-04-19

基金项目: 国家自然科学基金项目 (20974041, 21174056); 江南大学大学生创新训练计划资助 (2017242Y)

作者简介: 洪 慧 (1997-), 女, 浙江诸暨人, 本科在读。E-mail: 1040215203@vip.jiangnan.edu.cn

通信联系人: 朱 叶, E-mail: zhuye@jiangnan.edu.cn

The cell compatibility of colloidal particles and emulsions were also studied. Results showed that HA-CA have absorbance in the range of UVB. HA-CA can self-assemble into spherical colloidal particles with the size of about 95 nm in selective solvent. HA-CA colloidal particles could be used as particulate emulsifier to prepare oil-in-water Pickering emulsion in the broader range of pH and various concentration of NaCl. Despite HA-CA colloidal particles cannot stabilize the oil-water interface to form an emulsion when pH is 6.47, adding a little inorganic salt can greatly improve its emulsifying capacity in neutral condition. In addition, the colloidal particles as well as emulsions have great salt tolerance and cell compatibility. Moreover, HA-CA colloidal particles can also stabilize a wide range of oil-water system, which means it has a certain universality as a particle emulsifier.

**Key words:** hyaluronic acid; cinnamic acid; amphiphilic macromolecule; self-assembled colloidal particle; particulate emulsifier

20世纪初期, Ramsden<sup>[1]</sup>和Pickering<sup>[2]</sup>在研究含有氧化铁等多种微米级的固体颗粒的石蜡/水乳液体系时,首次发现了微米尺寸的固体粒子能吸附于石蜡与水的相界面形成粒子膜,降低油水表面张力,防止乳液滴聚集,这类固体颗粒可取代传统的有机小分子乳化剂用于稳定油水界面形成乳状液,具有表面活性,常被称为颗粒乳化剂,以之稳定的乳液称之为Pickering乳液。与传统的小分子乳化剂相比,颗粒乳化剂具备高效、稳定、低毒<sup>[3]</sup>等优势,在要求较高生物相容性的领域,如:日用化妆品、生物医用材料、食品<sup>[4]</sup>等具有良好的发展前景。最早开始使用的颗粒乳化剂有无机颗粒<sup>[5-6]</sup>,后续发展有表面改性或有机-无机杂化纳米粒子<sup>[7]</sup>,随着制备方法的发展,目前有机纳米颗粒乳化剂的种类主要有聚合物乳胶粒子<sup>[8]</sup>、聚合物微凝胶<sup>[9]</sup>以及大分子自组装胶体粒子<sup>[9-10]</sup>等。其中,大分子自组装胶体粒子由于优良的可设计性和丰富的组装类型而受到广泛关注。

2005年, Fujii等<sup>[11]</sup>首次报道将合成的三嵌段共聚物自组装形成胶体粒子,并以之为颗粒乳化剂稳定油水界面:首先合成三嵌段预聚物PEO-*b*-PGMA-*b*-PDEA,然后在吡啶中用丁二酸酐(SA)改性上述共聚物后得到两性离子三嵌段共聚物PEO-*b*-PSAGMA-*b*-PDEA,将该共聚物在选择性溶剂中制备壳交联的胶体粒子,并以之稳定十一醇/水乳液体系,由于该胶体粒子的壳层及核部链段均具有pH响应性,因而形成的乳液能够在pH变化时实现乳化—破乳—再乳化的循环过程。本课题组前期也做了大量关于以大分子自组装胶体粒子为颗粒乳化剂稳定Pickering乳液的研究<sup>[12-14]</sup>。但目前所报道的通过大分子自组装技术获得的纳米胶体粒子多基于合成聚合物,在一定程度上限制了其在食品、医药及化妆品中的应用,因此制备和发展具有良好生物相容性和环境友好型的颗粒乳化剂成为研究者的关注重点。近年来,基于天然大分子的颗粒乳化剂受到广泛关注,如淀粉<sup>[15]</sup>、纤维素<sup>[16]</sup>、壳聚糖等<sup>[17]</sup>。除此以外, To Ngai<sup>[18]</sup>等利用两亲性的天然大分子明胶制备颗粒乳化剂,并以之稳定Pickering高内相乳液,所得乳液在颗粒浓度为0.5 wt%时就有良好的稳定性,除此还对pH以及均质时间对乳液性能的影响进行了系统的研究。Yuan Zou<sup>[19]</sup>等利用玉米蛋白/单宁酸复合颗

粒稳定O/W型“凝胶状”乳液, 在油水界面上形成非共价连接的多层结构。

作为天然大分子之一的透明质酸(HA), 是由葡萄糖醛酸和N-乙酰氨基葡萄糖为重复单位组成的阴离子酸性粘多糖, 广泛存在于软结缔组织细胞外基质中<sup>[20]</sup>。HA具有优异的水溶性、保湿性、生物相容性、润滑性以及可降解性, 在生物医药, 食品以及高级化妆品领域应用较为广泛。国内外对于透明质酸多集中于纳米药物载体和组织工程等<sup>[21]</sup>。除此之外, 透明质酸在乳化剂领域的研究也有相关报道, 例如, Eenschooten<sup>[22]</sup>等用辛烯基琥珀酸酐(OSA)对HA酯化改性制备HA的酯化衍生物, 将改性后的HA作为大分子链乳化剂稳定乳液, 实验过程中对其乳化性能做了详细的研究。

本文选择具有紫外吸收性能的肉桂酸(CA)为单体, 将CA引入HA中将其疏水改性, 获得具有两亲性的HA-CA, 在选择性溶剂H<sub>2</sub>O/DMSO中通过亲疏水作用诱导其自组装形成HA-CA胶体粒子, 并以此胶体粒子为颗粒乳化剂制备Pickering乳液, 考察pH、盐浓度等因素对HA-CA胶体粒子形态及乳化性能的影响, 此外还通过体外细胞实验研究了不同浓度的HA-CA胶体粒子及其所稳定的Pickering乳液的细胞毒性。本文不仅制备了一种新型低毒性的大分子颗粒乳化剂, 还引入具有紫外吸收功能的疏水小分子的赋予颗粒乳化剂紫外吸收的特性, 为Pickering乳液在防晒领域的应用提供了新的思路。

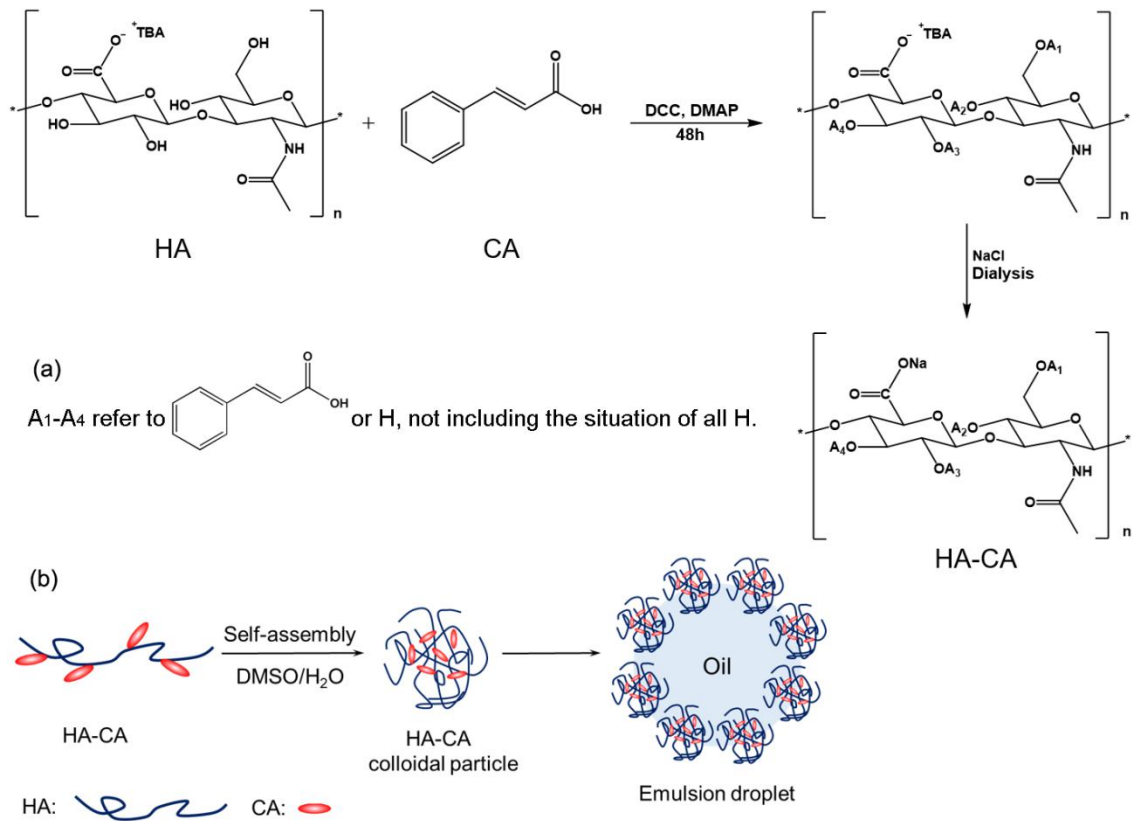


图1 (a) HA-CA的合成, (b) HA-CA胶体粒子的制备及其稳定油水界面的示意图

Fig. 1 Illustrations of (a) synthesis of HA-CA, and (b) preparation and interface behavior of HA-CA colloidal particles

## 1 实验部分

## 1.1 原料和试剂

透明质酸钠 (HA-Na): 化妆品级, 粘均分子量  $1.1 \times 10^4$  Da, 镇江东元生物科技有限公司; IR-120 阳离子交换树脂 (H 型): 百灵威试剂有限公司; 四丁基氢氧化铵 (TBA-OH): 上海麦格林生化科技有限公司; N,N-二环己基碳酰亚胺 (DCC): 化学纯, 国药集团化学试剂有限公司; 4-二甲氨基吡啶 (DMAP): 纯度 99%, 阿拉丁试剂有限公司; 肉桂酸 (CA)、苯乙烯、二甲亚砜 (DMSO)、无水乙醇、甘油、环己烷、液体石蜡、甲苯、二氯甲烷、乙酸乙酯、1-辛醇、二甲基硅油: 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司; 白油 (26#): 化妆品级, 上海文华化工颜料有限公司; 棕榈酸异辛酯、碳酸二辛酯、荷荷巴油、小麦胚芽油: 化妆品级, 贝丝泉; DMEM 培养液、胎牛血清、青霉素链霉素 (双抗)、胰蛋白酶、四甲基偶氮唑盐 (MTT): 无锡特达生物技术有限公司; 小鼠成纤维细胞 (L-929): 上海优选。

## 1.2 测试与表征

采用核磁共振仪 (德国 Bruker 公司 AVANCE III 型) 表征 HA 及 HA-CA 样品的结构, 其中 HA 的溶剂为  $D_2O$ , HA-CA 的溶剂为氘代 DMSO; 用紫外分光光度计 (北京普析通用公司 TU-1901 型) 测试 HA、CA 及 HA-CA 的紫外吸收谱图, 观察三者的紫外吸收波长及强度; 用纳米粒度仪及 Zeta 电位仪 (美国布鲁克海文仪器公司 Zeta-PALS 型) 测定 HA-CA 胶体粒子的粒径分布以及 Zeta 电位值; 通过透射电子显微镜 (日本电子公司 JEOL JEM-2100 型) 观察 HA-CA 胶体粒子的形貌; 使用扫描电子显微镜 (日本日立株式会社日立 S-4800 型) 观察 O/W 型乳液表面 HA-CA 胶体粒子的分布情况; 利用光学显微镜 (厦门麦克奥迪有限公司 BA400 Digital 型) 观察所得乳液的形态及类型; 使用多功能酶标仪 (上海迪奥生物科技有限公司 Tecan Infinite M200 PRO 型) 检测含 HA-CA 胶体粒子及乳液的培养液中细胞的活性。

## 1.3 实验步骤

### 1.3.1 HA-TBA 的制备

将 1.0 g HA-Na 溶于去离子水制成质量分数为 1% 的溶液, 在溶液中加入 3.0 g H 型阳离子交换树脂, 常温搅拌 5 h 后过滤除去阳离子交换树脂。滤液用 25% 的 TBA-OH 调节 pH 至 7.0~7.1, 所得溶液冷冻干燥后得 HA 与 TBA-OH 复配物 HA-TBA<sup>[23]</sup>。

### 1.3.2 HA-CA 的合成

称取 0.5 g (1.08 mmol) HA-TBA 溶于 15 mL 无水 DMSO, 完全溶解后加入 2.68 g (13.78 mmol) DCC 和 1.06 g (8.58 mmol) DMAP, 在向反应体系中加入 1.28 g (8.65 mmol) CA, 反应体系在 60 °C 下进行 48 h。反应结束后, 抽滤除去不溶物质, 所得滤液用无水乙醇 (200 mL) 进行沉淀, 并离心收集。随后, 用 15 mL DMSO 溶解离心所得沉淀物, 溶液转入透析袋 (MWCO=3500 Da), 用质量浓度为 0.01 mg/mL 氯化钠溶液透析 1 d 以除去体系中的 TBA, 再用去离子水透析 7~8 d, 冷冻干燥即可得到固态 HA-CA, HA-CA 合成路线如图 1 (a) 所示。

### 1.3.3 HA-CA 胶体粒子及其乳化行为

将 HA-CA 溶于 DMSO 中, 配成 10 mg/mL 的溶液, 以 10  $\mu$ L/min 的速度向 HA-CA 的 DMSO 溶液中滴加超纯水, 当达到临界水含量时, HA-CA 自组装形成胶体粒子; 此时在混合溶液中加入大量超纯水固定胶体粒子, 搅拌 6 h 后, 将其转入透析袋透析 7~8 d, 即可获得 HA-CA 胶体粒子分散液, 冷冻干燥可获得 HA-CA 胶体粒子粉末。

取 3 mL HA-CA 胶体粒子的水分散液与白油等体积混合, 室温下使用 XHF-D 高速分散器将其以 20000 r/min 的转速均质 3 min, 得到 HA-CA 胶体粒子稳定的 Pickering 乳状液, 通过水分散法以及光学显微镜确定乳状液的类型, 并观察乳状液液滴的大小。

### 1.3.4 HA-CA 胶体粒子及乳液的细胞相容性测试

本实验选用小鼠成纤维细胞 (L-929) 为测试对象, 将其放入 DMEM 培养基中 (培养基添加 10% 胎牛血清+100 U/mL 氨苄青霉素+100  $\mu$ g/mL 硫链霉素) 进行细胞培养。细胞培养条件: 温度为 37  $^{\circ}$ C、相对湿度 (RH) 为 95% 以及含 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱。

当细胞生长接近融合时, 用胰蛋白酶进行消化, 获取细胞悬浮液。离心获得细胞后, 用 DMEM 调节细胞浓度, 将细胞接种至 96 孔细胞培养板中, 每组 6 个复孔, 每孔 100  $\mu$ L 细胞悬浮液。将培养板置于相同条件的培养箱中培养 24 h 至细胞贴壁生长, 除去培养液。阴性对照组: 只含 DMEM 培养液; 阳性对照组: 含 10% 和 30% DMSO 的培养液; 实验组: 含 10% 和 30% 1.0 mg/mL、3.0 mg/mL 和 5.0 mg/mL HA-CA 胶体粒子分散液以及 10%、30% 的乳液 (HA-CA 胶体粒子分散液的浓度为 1.0 mg/mL、盐浓度为 0.05 mol/L) 的培养液, 细胞在上述环境中培养 24 h 后, 在光学显微镜下观察其形状。

采用四甲基偶氮唑盐 (MTT) 法来考察 HA-CA 胶体粒子以及所得乳液的细胞相容性。在上述细胞培养板中加入 10  $\mu$ L MTT 溶液, 浓度为 5 mg/mL, 细胞继续培养 4 h 后, 吸出孔内的培养液。每孔加入 100  $\mu$ L DMSO 溶液, 使孔内蓝紫色结晶物 (甲瓚) 充分溶解, 利用多功能酶标仪测定各孔在 570 nm 波长的吸光度值 (即 OD 值), 利用 OD 值计算细胞相对增殖度 (RGR):

$$\text{RGR} (\%) = (\text{实验组 OD 值} / \text{阴性对照组 OD 值}) \times 100\%$$

## 2 结果与讨论

### 2.1 HA-CA 的结构表征

HA 与 HA-CA 的 <sup>1</sup>H-NMR 谱图如图 2 所示, 与未改性的 HA 的谱图相比, HA-CA 同样在化学位移为 1.0~2.0 处出现了 -CH<sub>3</sub> 的质子峰, 而由于位于乙酰葡萄糖胺上的 -OH 发生酯化反应, 使得 -CH<sub>3</sub> 电子云密度发生变化, 导致乙酰葡萄糖胺上 -CH<sub>3</sub> 质子峰发生偏移, 因而两者的 -CH<sub>3</sub> 质子峰在两个不同的位置出现; 图 2 (b) 中化学位移为 7~8 处出现了苯环质子峰, 证明 CA 成功接入透明质酸主链。利用图 2 (b) HA-CA 上苯环的质子峰面积与 HA 上 -CH<sub>3</sub> 的质子峰面积的比值计算可得 HA-CA 接枝率为 20%, 该样品被命名为 HA-CA20。

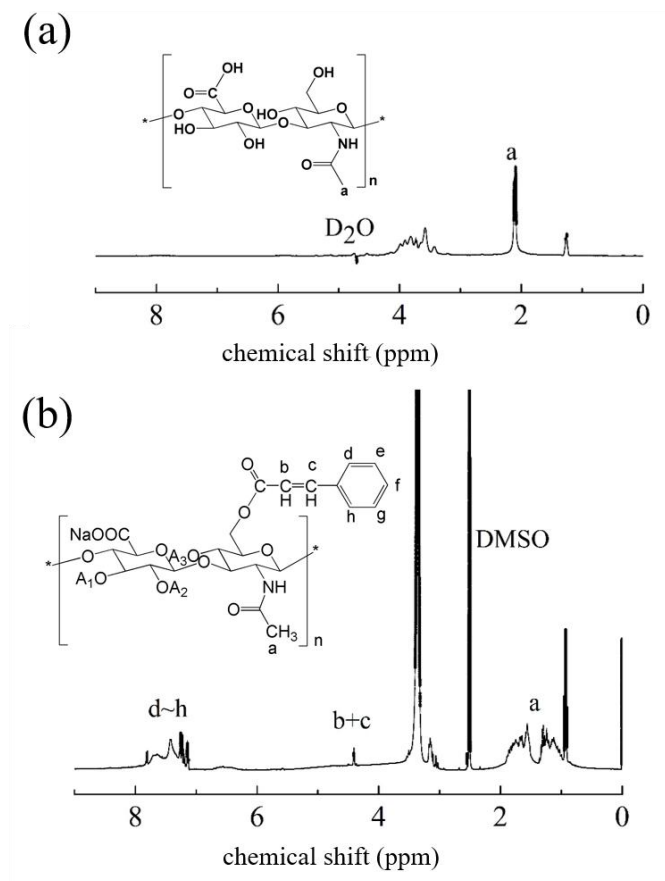


图2 HA(a)与 HA-CA(b)的核磁共振氢谱图

Fig. 2  $^1\text{H}$ -NMR spectra of HA(a) and HA-CA(b)

图3为HA、CA以及HA-CA的紫外吸收谱图。由于CA含有苯环和双键不饱和的共轭结构，在255~310 nm范围内出现较强的紫外吸收峰，改性后的HA在250~320 nm也具有紫外吸收，与CA相比紫外吸收强度较小，但吸收波长范围较宽，而HA在此区间无紫外吸收，证明HA改性成功。

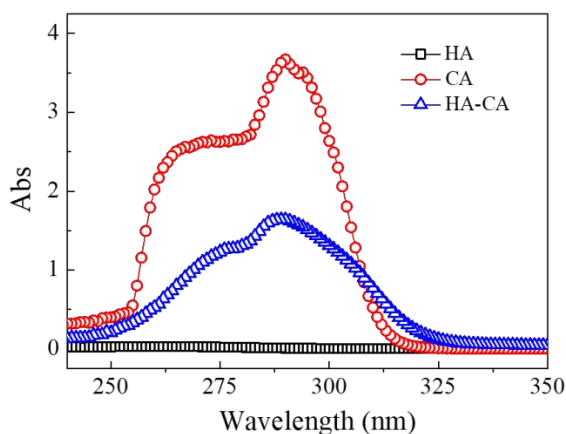


图3 HA、CA和HA-CA的紫外吸收谱图

Fig. 3 UV-Vis spectra of HA, CA and HA-CA

## 2.2 HA-CA<sub>20</sub>胶体粒子的表征

HA-CA可以在选择性溶剂中自组装形成球形粒子, 通过纳米粒度仪和TEM对胶体粒子的粒径以及形貌进行表征, 结果如图4所示。纳米粒度仪的结果显示HA-CA<sub>20</sub>胶体粒子的粒径分布呈现单峰分散状态, 其平均粒径约为95 nm。图4 (b) 为TEM拍摄的HA-CA<sub>20</sub>胶体粒子形貌图, 胶体粒子明显呈球体, 平均粒径为90 nm左右, 与纳米粒度仪所测得的粒径相符。

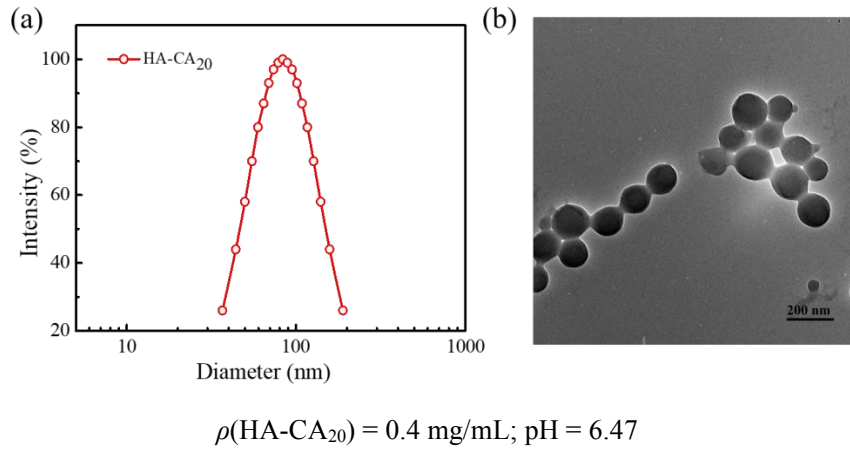


图4 HA-CA<sub>20</sub>胶体粒子的粒径分布图 (a) 及TEM形貌图 (b)

Fig. 4 The particle size distribution(a) and TEM images(b) of HA-CA<sub>20</sub> colloidal particles

由于HA-CA含有羧酸基团, 因而HA-CA胶体粒子对pH的变化具有响应性。图5为0.4 mg/mL的HA-CA<sub>20</sub>胶体粒子在不同pH下的平均粒径、粒径分布及Zate电位的变化。图5 (b) 中可以观察到随着pH的增加, 胶体粒子的D<sub>h</sub>先增加后减小, 同图5 (a) 中纳米粒度仪所测得的胶体粒子粒径分布变化相同。原因可能是随着pH的增加, 羧基不断转化为羧酸根离子, 使得HA-CA<sub>20</sub>分子链间的排斥力持续增加, 导致组装形成的胶体粒子粒径增加。当pH达到9左右时, 羧基已充分质子化, 此时链段亲水性较强, 胶体粒子的结构发生解离, 因此HA-CA胶体粒子的粒径呈减小的趋势, 且粒径分布较宽<sup>[24]</sup>。从图5 (b) 中可观察到随着pH的增加, Zeta电位值逐渐减小, 在pH达到7左右时, 随着pH的增加Zeta电位值趋于稳定, 此时羧酸已充分电离, 证实了上述分析。

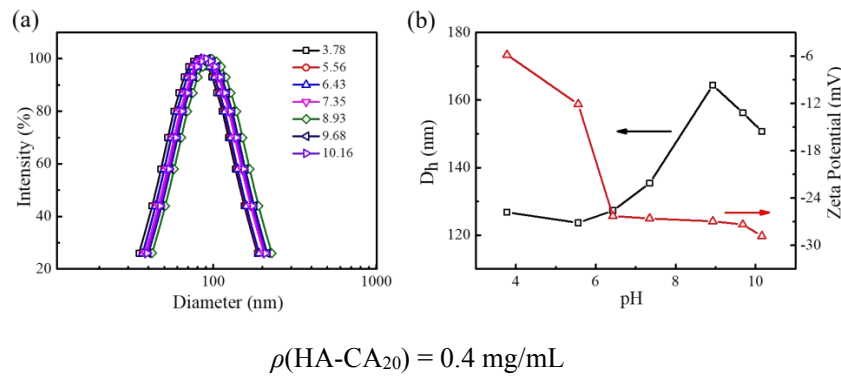
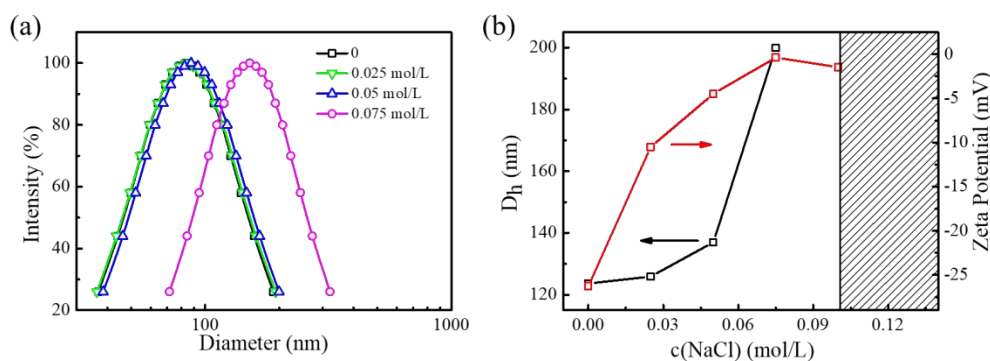


图5 HA-CA<sub>20</sub>胶体粒子的粒径分布 (a)、平均粒径和Zate (b) 电位随pH的变化

Fig. 5 Particle size distribution (a), average particle size and Zate potential (b) of HA-CA<sub>20</sub> colloidal particles at different pH value

无机盐的存在不仅会促进HA-CA中羧基的电离,也会对羧酸基团产生静电屏蔽作用<sup>[25]</sup>。图6为pH为6.47时盐浓度对HA-CA<sub>20</sub>胶体粒子的影响,图6(b)可见随着盐浓度的增加,胶体粒子的 $D_h$ 逐渐增加,与(a)中展现的胶体粒子粒径分布的变化相同。这可能是由于pH为6.47时,羧基已充分电离,NaCl主要起到静电屏蔽作用使胶体粒子之间的排斥力减小,胶体粒子因而发生不同程度的团聚,使得胶体粒子的 $D_h$ 逐渐增加。图6(b)可见HA-CA胶体粒子Zeta电位值随着盐浓度的增加逐渐增加,从而证实以上猜测。当盐浓度达到0.1mol/L时,胶体粒子分散液呈弱絮凝状态,其粒径达微米级,并且胶体粒子分散液产生沉淀,无研究价值。



$$\rho(\text{HA-CA}_{20}) = 0.4 \text{ mg/mL}; \text{pH} = 6.47$$

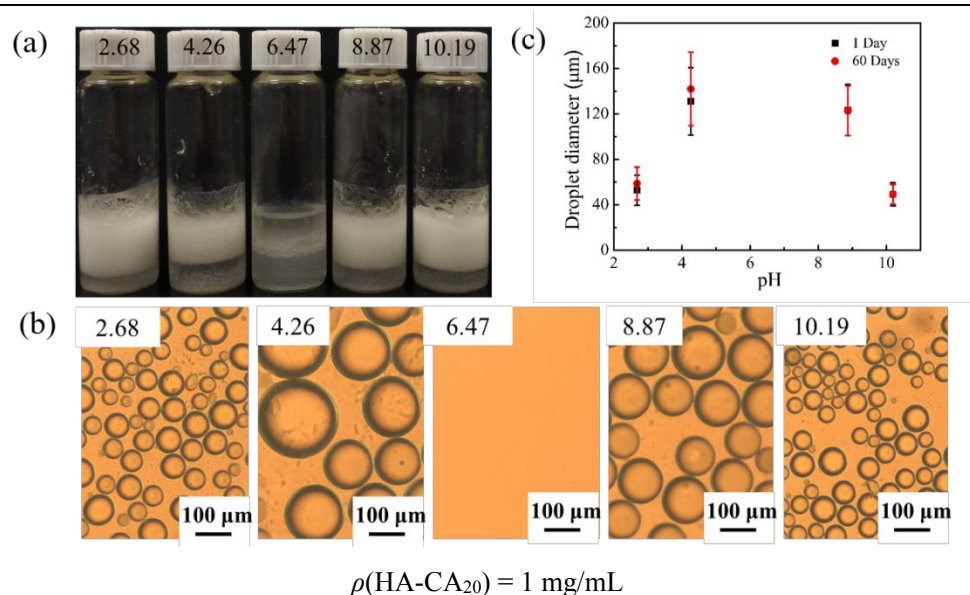
图6 HA-CA<sub>20</sub>胶体粒子的粒径分布、平均粒径和Zate电位随盐浓度的变化

Fig. 6 Particle size distribution (a), average particle size and Zate potential (b) of HA-CA<sub>20</sub> colloidal particles at different salt concentration

### 2.3 HA-CA<sub>20</sub> 胶体粒子乳化性能的研究

将1 mg/mL的HA-CA<sub>20</sub>胶体粒子分散液与等体积的白油在不同的pH下混合,在室温下均质2min后获得乳液照片和显微镜图如图7所示。从图中7(a)、(b)中可明显观察到在pH为6.47时,有油水分层现象,显微照片中也没有乳液滴的存在,此时HA-CA<sub>20</sub>胶体粒子没有乳化效果;而在酸性或碱性条件下,胶体粒子均具有良好的乳化效果,并且由于不同pH会对HA-CA胶体粒子形态及粒径产生影响,获得的乳液滴粒径也不相同。从图7(c)可以得出,乳液滴粒径会随pH的增加先增加后减小。这可能是由于在酸性条件下,羧基的电离度低,因而HA-CA<sub>20</sub>胶体粒子的亲水性低,胶体粒子亲疏水性适当,并且由图5可知,pH较小时所获得的HA-CA<sub>20</sub>胶体粒子的粒径也较小,有利于胶体粒子对油水界面的稳定。随着pH的增加,羧基逐渐电离使得胶体粒子亲水性增加,使胶体粒子易从油水界面进入水相,乳化性能变差,乳液滴会不同程度的聚集,乳液滴的粒径变大,甚至直接破乳,如pH为6.47时,油水界面明显分层,无法形成稳定的乳液。随着pH的进一步增加,HA-CA<sub>20</sub>胶体粒子亲水性增加,胶体粒子发生解离,以分子链的形式存在于油水界面,亲水分子HA分子链存在于水相中,而疏水的CA基团则位于油相中,这时同样可以获得稳定的乳状液。



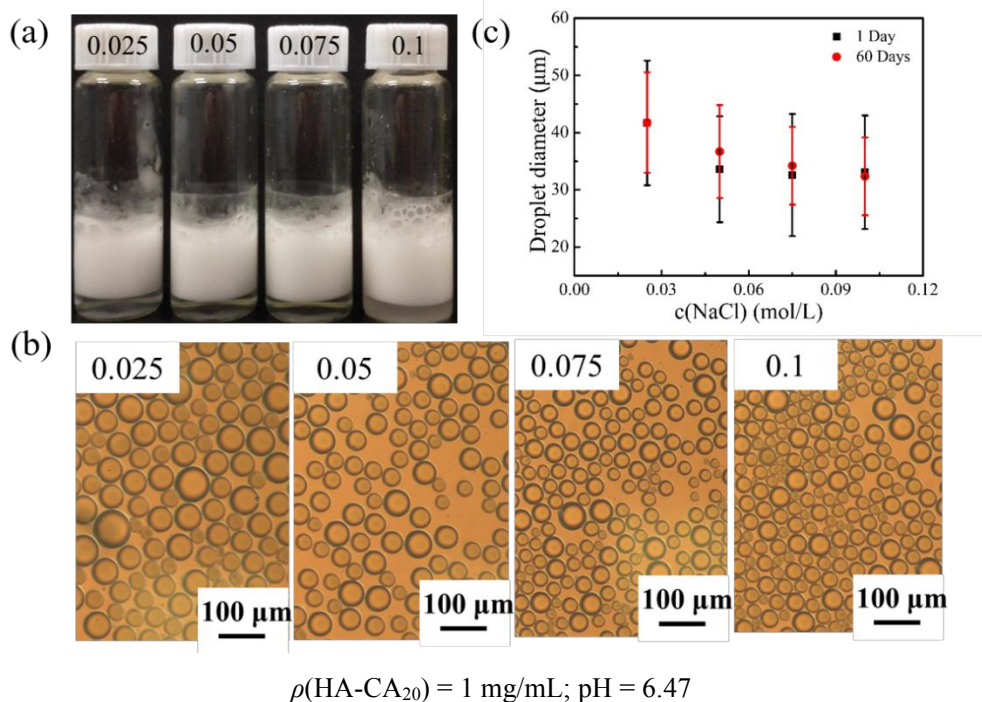


$$\rho(\text{HA-CA}_{20}) = 1 \text{ mg/mL}$$

图7 不同pH条件下获得的HA-CA<sub>20</sub>胶体粒子稳定油水界面的照片 (a)、乳液滴的显微镜照片 (b) 及乳液滴粒径分布 (c)

Fig. 7 Digital pictures (a), optical microscope images (b) and size distribution (c) of emulsions and emulsion droplets stabilized by HA-CA<sub>20</sub> colloidal particle at different pH value

由于无机盐的浓度会使HA-CA胶体粒子间产生静电屏蔽、影响胶体粒子的粒径, 因而对胶体粒子的乳化性能也有所影响。将1 mg/mL的HA-CA<sub>20</sub>胶体粒子分散液与等体积的白油很合、均质, 并分别加入不同质量浓度的无机盐, 所的乳液如图8所示。可见在pH为6.47时, 加入少量的无机盐, HA-CA<sub>20</sub>胶体粒子可从无法形成稳定乳液变为可以制备Pickering乳液, 并且随着NaCl溶液浓度的增加, 乳液滴的粒径逐渐减小, 这是由于无机盐产生的静电屏蔽作用, 使得羧基去质子化程度降低, 胶体粒子间的静电斥力减小, 有助于胶体粒子在油水界面形成致密的粒子膜, 有利于获得乳液滴粒径较小的乳状液。由图6可知, 当无机盐的浓度达到0.1 mol/L时, 虽HA-CA<sub>20</sub>胶体粒子呈现絮凝状态, 但同样可以获得乳液滴粒径较小的乳状液。

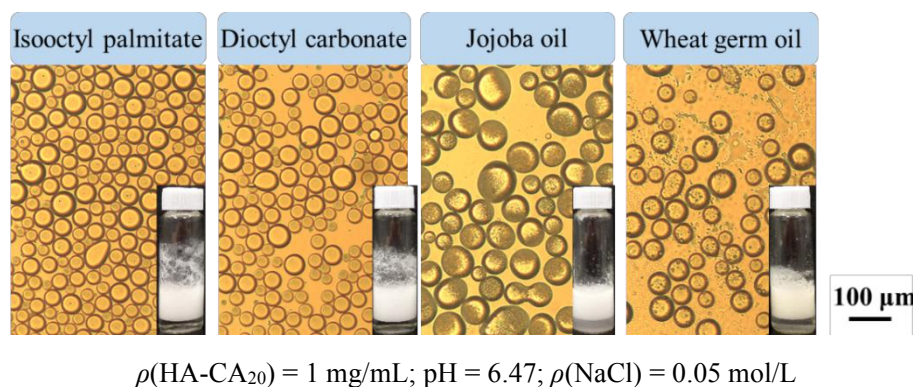


$\rho(\text{HA-CA}_{20}) = 1 \text{ mg/mL}$ ;  $\text{pH} = 6.47$

图8 不同盐浓度 (mol/L) 下获得的HA-CA<sub>20</sub>胶体粒子稳定油水界面的照片 (a)、乳液滴的显微镜照片 (b) 及乳液滴粒径分布 (c)

Fig. 8 Digital pictures (a), optical microscope images (b) and size distribution (c) of emulsions and emulsion droplets stabilized by HA-CA<sub>20</sub> colloidal particle at different salt concentration

将1 mg/mL的HA-CA<sub>20</sub>胶体粒子分散液用以稳定多种化妆品用油, 研究其对不同化妆品用油的乳化性能。如图9所示, HA-CA<sub>20</sub>胶体粒子除可稳定白油外, 还可稳定棕榈酸异辛酯、碳酸二辛酯、荷荷巴油和小麦胚芽油等多种化妆品用油, 且所制乳状液可稳定放置3月, 具有长期稳定性。以上现象说明HA-CA<sub>20</sub>胶体粒子具有一定的普适性, 在化妆品领域具有潜在的运用价值。



$\rho(\text{HA-CA}_{20}) = 1 \text{ mg/mL}$ ;  $\text{pH} = 6.47$ ;  $\rho(\text{NaCl}) = 0.05 \text{ mol/L}$

图9 HA-CA<sub>20</sub>胶体粒子稳定不同油相的数码照片及乳液滴的显微镜图片

Fig. 9 Digital pictures of emulsions and optical microscope images of emulsions droplets stabilized by HA-CA<sub>20</sub> colloidal particles with different oils.

通过苯乙烯油相固化法可直观地观察胶体粒子在油水界面二次组装后的形貌, 从图10 (b) SEM的局部放大图可见HA-CA<sub>20</sub>胶体粒子致密的分布在油水界面, 且在经历均质、加热等操作后胶体粒子仍然为球体,

说明HA-CA<sub>20</sub>胶体粒子稳定的乳液具有较好的热稳定性。

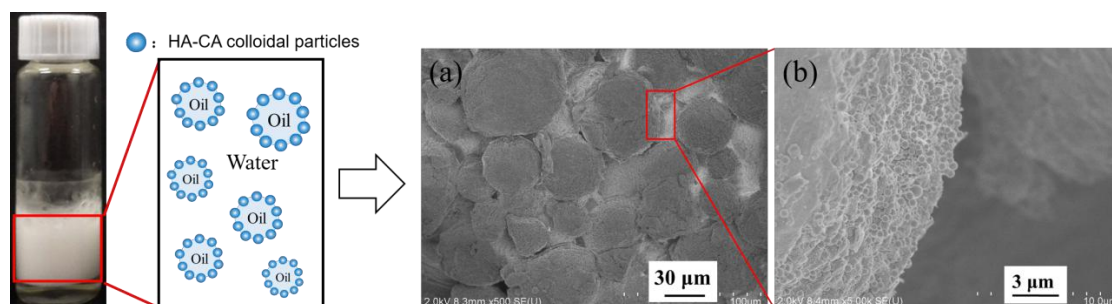
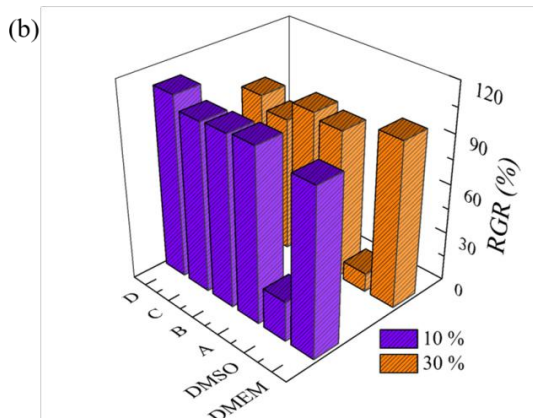
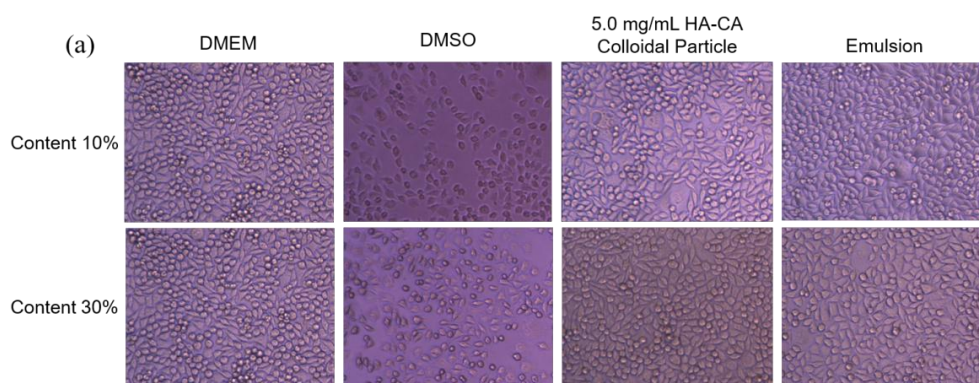


图10 HA-CA<sub>20</sub>胶体粒子稳定的苯乙烯/水乳液 (a) ;乳液固化后的SEM图 (b) 及其局部放大图 (c)

Fig. 10 Illustrations of HA-CA<sub>20</sub> colloidal particles stabilized styrene/water emulsions (a) ; SEM images of emulsions after solidified (b) and drawing of partial enlargement (c)

## 2.4 细胞相容性研究

将L-929细胞分别放入DMEM培养液、含DMSO培养液、含HA-CA<sub>20</sub>胶体粒子分散液以及含乳液的培养液中培养24 h, 观察细胞的形态。结果如图11 (a) 所示, 处于DMEM培养液中L-929细胞, 24 h后细胞为较为伸展的梭形形态, 说明此时细胞处于良好的生长状态; 在含DMSO培养液中培养24 h后, 细胞为团状的形态并且细胞数量较少, 说明在此条件下细胞生长受到明显限制; 在含HA-CA<sub>20</sub>胶体粒子分散液以及乳液的培养液中, 细胞仍为伸展的梭形形态与阴性对照组的细胞形态相同, 证明HA-CA<sub>20</sub>胶体粒子以及乳液没有影响细胞的生长, 具有良好的细胞相容性, 具有实际应用的价值。



$\rho(\text{HA-CA}_{20}) = 1 \text{ mg/mL}$ ;  $\text{pH} = 6.47$ ;  $\rho(\text{NaCl}) = 0.05 \text{ mol/L}$

图11 HA-CA<sub>20</sub>胶体粒子以及乳液对L-929细胞的影响(a)以及不同样品细胞的活性(A: 1.0 mg/mL HA-CA<sub>20</sub>胶体粒子, B: 3.0 mg/mL HA-CA<sub>20</sub>胶体粒子, C: 5.0 mg/mL HA-CA<sub>20</sub>胶体粒子, D: 乳液) (b)

Fig. 11 Effect of HA-CA<sub>20</sub> colloidal particles and emulsions on L-929 cells(a) and Cell viability of L-929 for different samples: The concentration of HA-CA<sub>20</sub> colloidal particles was 1.0 mg/mL (A), 3.0 mg/mL (B), 5.0 mg/mL (C), and emulsion (D) was stabilized by HA-CA<sub>20</sub> colloidal particles with the concentration of HA-CA<sub>20</sub> colloidal particles was 1.0 mg/mL(b).

图11(b)为各样品RGR值的计算结果, DMEM作为阴性对照组, 其RGR值为100%, 无细胞毒性; DMSO为阳性对照组, 培养后的细胞数量明显下降, 说明DMSO毒性较高; 实验组: 胶体粒子分散液的RGR值均在85%以上, 说明HA-CA<sub>20</sub>胶体粒子不会影响细胞增殖具有优异生物相容性; 所制乳液的RGR值大于100%, 可能是由于有少量油相漂浮在培养基表面等现象, 使得培养板中细胞的生长环境发生微妙变化, 获得了有利于细胞增殖的环境。

### 3 结论

光敏改性的HA-CA可通过亲疏水作用在选择性溶剂DMSO/H<sub>2</sub>O中自组装形成球形胶体粒子, 且以HA-CA胶体粒子为颗粒乳化剂可获得O/W型Pickering乳液。

(1) HA-CA胶体粒子含有羧基, 因而具有pH响应性, 在少许无机盐存在的情况下, 胶体粒子可以在较宽的pH范围内稳定油水界面, 且所得乳液具有较好的长期稳定性。

(2) HA-CA胶体粒子具有一定的紫外吸收性, 且其所稳定的乳液具有良好的耐盐性和细胞相容性; 此外HA-CA胶体粒子还可以稳定白油、棕榈酸异辛酯、碳酸二辛酯等诸多种化妆品用油, 具有一定的普适性。

### 参考文献:

- [1] RAMSDEN W. Separation of solids in the surface-layers of solutions and 'suspensions' (observations on surface-membranes, bubbles, emulsions, and mechanical coagulation).—Preliminary account[J]. Proceedings of the Royal Society of London, 1904, 72(477-486): 156-164.
- [2] PICKERING S U. CXCVI.-Emulsions[J]. Journal of the Chemical Society, Transactions, 1907, 91(0): 2001-2021.
- [3] BINKS B P. Particles as surfactants - similarities and differences[J]. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 2002, 7(1-2): 21-41.
- [4] LIU Fu, TANG Chuan-He. Phytosterol colloidal particles as pickering stabilizers for emulsions[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(22): 5133-5141.
- [5] BON S A F, COLVER P J. Pickering miniemulsion polymerization using Laponite clay as a stabilizer[J]. Langmuir, 2007, 23(16): 8316-8322.



- [6] DUAN Lingli, CHEN Min, ZHOU Shuxue, et al. Synthesis and characterization of poly(N-isopropylacrylamide)/silica composite microspheres via inverse pickering suspension polymerization[J]. *Langmuir*, 2009, 25(6): 3467-3472.
- [7] DIEZ-PASCUAL A M, XU C, LUQUE R. Development and characterization of novel poly(ether ether ketone)/ZnO bionanocomposites[J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2014, 2(20): 3065-3078.
- [8] MORSE A J, ARMES S P, THOMPSON K L, et al. Novel pickering emulsifiers based on pH-responsive poly(2-(diethylamino)ethyl methacrylate) latexes[J]. *Langmuir*, 2013, 29(18): 5466-5475.
- [9] NGAI T, AUWETER H, BEHRENS S H. Environmental responsiveness of microgel particles and particle-stabilized emulsions[J]. *Macromolecules*, 2006, 39(23): 8171-8177.
- [10] 谢亚珍, 刘敬成, 胡琼. 双亲性共聚物P(St/VBT-co-MA)自组装胶束的制备及其乳化性能[J]. *功能高分子学报*, 2016, 29(2):200-206
- [11] FUJII S, CAI Y L, Weaver J V M, et al. Syntheses of shell cross-linked micelles using acidic ABC triblock copolymers and their application as pH-responsive particulate emulsifiers[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2005, 127(20): 7304-7305.
- [12] LIU Xiaoya, YI Chenglin, ZHU Ye, et al. Pickering emulsions stabilized by self-assembled colloidal particles of copolymers of P(St-alt-MAn)-co-P(VM-alt-MAn)[J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2010, 351(2): 315-322.
- [13] WEI Wei, WANG Ting, LUO Jing, et al. Pickering emulsions stabilized by self-assembled colloidal particles of amphiphilic branched random poly(styrene-co-acrylic acid)[J]. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects*, 2015, 487:58-65.
- [14] YI Chenglin, YANG Yiqun, ZHU Ye, et al. Self-assembly and emulsification of poly{ styrene-alt-maleic acid -co- styrene-alt-(N-3,4-dihydroxyphenylethyl-maleamic acid) } [J]. *Langmuir*, 2012, 28(25): 9211-9222.
- [15] TAN Ying, XU Kun, NIU Cheng, et al. Triglyceride-water emulsions stabilized by starch-based nanoparticles[J]. *Food Hydrocolloids*, 2014, 36: 70-75.
- [16] ZOPPE J O, VENDITTI R A, ROJAS O J. Pickering emulsions stabilized by cellulose nanocrystals grafted with thermo-responsive polymer brushes[J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2012, 369,: 202-209.
- [17] LIU Hao, WANG Chaoyang, ZOU Shengwen, et al. Simple, Reversible emulsion system switched by pH on the basis of chitosan without any hydrophobic modification[J]. *Langmuir*, 2012, 28(30): 11017-11024.
- [18] TAN Huan, SUN Guanqing, LIN Wei, et al. Gelatin particle-stabilized high internal phase emulsions as nutraceutical containers[J]. *Acs Applied Materials & Interfaces*, 2014, 6(16): 13977-13984.
- [19] ZOU Yuan, GUO Jian, YIN Shouwei, 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.

[20] LI Ling, WANG Ning, JIN Xun, et al. Biodegradable and injectable in situ cross-linking chitosan-hyaluronic acid based hydrogels for postoperative adhesion prevention[J]. Biomaterials, 2014, 35(12): 3903-3917.

[21] OELSCHLAEGE C, BOSSLER F, WILLENBACHER N. Synthesis, structural and micromechanical properties of 3D hyaluronic acid-based cryogel scaffolds[J]. Biomacromolecules, 2016, 17(2): 580-589.

[22] TOMMERAAS K, MELLERGAARD M, MALLE B M, et al. New amphiphilic hyaluronan derivatives based on modification with alkenyl and aryl succinic anhydrides[J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 85(1): 173-179.

[23] QIN Xiaohua, GRUBER P, MARKOVIC M, et al. Enzymatic synthesis of hyaluronic acid vinyl esters for two-photon microfabrication of biocompatible and biodegradable hydrogel constructs[J]. Polymer Chemistry, 2014, 5(22): 6523-6533.

[24] GUO Peide, GUAN Wenyan, LIANG Li, et al. Self-assembly of pH-sensitive random copolymers: Poly(styrene-co-4-vinylpyridine)[J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2008, 323(2): 229-234.

[25] BINKS B P, MURAKAMI R, ARMES S P, et al. Effects of pH and salt concentration on oil-in-water emulsions stabilized solely by nanocomposite microgel particles[J]. Langmuir, 2006, 22(5): 2050-2057