

月见草油微乳冻干粉性能研究

吴红艳^{1,2}, 孙长豹¹, 刘宁², 郭成宇¹

(1. 齐齐哈尔大学食品与生物工程学院, 黑龙江齐齐哈尔 161006)

(2. 东北农业大学食品学院, 黑龙江哈尔滨 150030)

摘要: 研究冻干保护剂对月见草油微乳冻干粉性能的影响并对冻干粉稳定性进行考察。采用 DSC 法分析微乳冻干粉中苏丹 II 的存在形式; 以外观性状、粒径、再分散性为指标对微乳冷冻干燥中所使用的冻干保护剂进行筛选; 以包封率为指标考察贮藏温度和时间对冻干粉稳定性的影响。结果显示以甘露醇为冻干保护剂的月见草油微乳冻干粉形态好复水速度快, 复溶后粒径变大。冻干粉在 37 °C 下贮存 6 个月后, 微乳包封率从原来的 90.92±0.79% 下降为 82.58±0.66%, 变化显著; 4 °C 和 20 °C 下贮存包封率分别为 89.50±0.76%、88.80±0.98%, 下降较少。DSC 数据显示苏丹 II 的加入对微乳冻干粉的热性能没有影响, 苏丹 II 以无定形形式存在于冻干粉中。以月见草油为油相, 以甘露醇为冻干保护剂制备的微乳冻干粉性质稳定, 包封率较高, 在室温下贮存 6 个月无明显变化。

关键词: 微乳液; 保护剂; 冷冻干燥; 月见草油

文章编号: 1673-9078(2014)9-109-113

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2014.09.019

Performance Study on Microemulsion Lyophilized Powder of Evening Primrose Oil

WU Hong-yan^{1,2}, SUN Chang-bao¹, LIU Ning², GUO Cheng-yu¹

(1. College of Food and Biological Engineering, Qiqihar University, Qiqihar 161006, China)

(2. College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: To investigate the effects of cryoprotectants on the freeze-drying of evening primrose oil microemulsion and its stability, the distribution of Sudan II in the lyophilized powder was analyzed by differential scanning calorimeter (DSC). The cryoprotectants for the microemulsion were screened in terms of appearance, size and powder disperse ability. The stability of the powder under various conditions of storage time and temperature was investigated with the entrapment efficiency as the observing index. In summary, mannitol was shown to be the best cryoprotectant. The lyophilized powder showed good granular pattern, dispersion speed, and large-sized particles. After storage for six months, the entrapment efficiency was decreased from 90.92% to 82.58±0.66% at 37 °C; while it only decreased to 89.50% and 88.80% on at 4 °C and 20 °C, respectively. DSC results showed that Sudan II had no effect on thermal property of the microemulsion lyophilized powder and existed as amorphous pattern. The microemulsion lyophilized powder, prepared using evening primrose oil as the oily phase and mannitol as the lyoprotectant, was stable, with high entrapment efficiency and no significant change after stored for 6 months.

Key words: microemulsion; cryoprotector; freeze-drying; evening primrose oil

微乳液是由水相、油相、表面活性剂与助表面活性剂在适当的比例下自发形成的一种透明的或者半透明的、低黏度的、各向同性并且热力学稳定的油水混合体系^[1]。液态的微乳在长期放置过程中会受外界因素的影响使其包封的物质化学性质不稳定, 易氧化,

收稿日期: 2014-03-18

基金项目: 黑龙江省自然科学基金项目 (C201333); 黑龙江省教育厅科学技术研究项目 (12541878)

作者简介: 吴红艳 (1969-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品化学与食品添加剂的研究

通讯作者: 刘宁 (1960-), 男, 教授, 博士研究生, 博士生导师, 主要从事营养与黏膜免疫研究

水解等, 进而发生凝聚、融合并导致其包封物质的泄露, 不利于保存和运输^[2-4]。冻干乳是在乳剂中加入冷冻保护剂, 采用低温冷冻干燥技术将乳剂制备成固体形态的一种制剂, 在使用前加水使其复原成液态乳剂, 也可以干粉状直接加入到食品中, 从而提高其溶解性、流动性和贮藏稳定性^[5-7]。目前国内外有关脂质体冻干制剂报道日益增多^[8-11], 但有关微乳冻干粉的研究鲜有报道, Karthik 等^[12]2013 年发表了有关 DHA 微胶囊化的研究, 其中探讨了不同的干燥方法对于 DHA 微乳的稳定性的影响。李欣^[13]对多西紫杉醇亚微乳的冻干工艺进行了研究, 考察冻干保护剂对冻干乳相关性质的影响。

试验选择的月见草油微乳的配方为6:1的O/W型微乳,这种微乳可无限稀释,即在固定的混合表面活性剂和油相比例下,可以无限增加水量,而始终保持微乳的状态。水量的增加有利于冻干保护剂的溶解和分散。试验主要研究在冷冻干燥过程中冻干保护剂对微乳冻干特性的影响,同时对月见草油冻干粉的稳定性进行了研究。

冻干微乳制剂作为一种新型的功能性载体,是一种固态制剂,避免了液态乳的不足,具有更好的热力学、动力学和生物学稳定性。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

吐温-80、月桂酸、苏丹II、甘露醇、甘氨酸、乳糖,国药集团化学试剂有限公司;海藻糖,阿拉丁化学试剂有限公司;月见草油,长白山保护开发区长白山生态产品有限公司;实验中所用水为超纯水。

S-4300扫描电子显微镜,日本HITACHI公司;Nano-ZS90型马尔文粒径分析仪,英国马尔文仪器有限公司;Q-20DSC差示扫描量热仪,美国TA公司;TU-1901双光束紫外可见分光光度计,北京普析仪器有限公司;C-MAG HS 4数显型磁力搅拌器,德国IKA;DL-360E型智能超声波清洗器,江苏省昆山市超声仪器有限公司;Heal Force PW系列超纯水器,力新仪器上海有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 月见草油微乳的制备

吐温-80:月桂酸以10:1比例配制混合乳化剂,再以混合乳化剂:月见草油为6:1比例置于恒温磁力搅拌器上进行混合,温度为25℃,待乳化剂与油已经充分混匀后,逐滴加入水,直到形成微乳。

1.2.2 月见草油微乳冻干粉制备

将添加了冻干保护剂的微乳放入-60℃的深冻冰箱内冻结12h。然后将其放入温度已降到-60℃左右的真空冷冻干燥机内,冻干48h后取出,密封后放入抽真空干燥器中备用。

1.2.3 冻干粉SEM(扫描电镜)、TEM(透射电镜)形态观察

将冻干粉用双面导电性胶带粘于观察台上,使用镀膜仪喷金,将处理好的样品放入样品盒观察颗粒形貌。

将微乳稀释100倍,滴加约2μL在铜网上,自然晾干,用2%的磷钨酸进行负染,15min后吸取多余

液体上电镜观察其形态。

1.2.4 冻干粉DSC(差式扫描量热法)分析

温度范围为20~200℃,升温速度10℃/min,参比为空铝坩锅。

1.2.5 微乳冻干粉稳定性的测定

冻干粉在4℃,室温(20℃),37℃条件下放置60d测定其包封率,考察贮存温度、时间对微乳冻干粉稳定性的影响。

1.2.6 包封率的测定

利用紫外分光光度法(λ_{312})测定苏丹II含量,回归方程为: $y = 0.0536x + 0.0005$, $R^2 = 0.9999$ 。

破乳方法:称取微乳10mL,加入无水硫酸铵5.0g,间断超声10min,70℃水浴10min,25℃离心(10000r/min)1h可分离得到水相和油相。将过量的苏丹II溶解于月见草油中,离心取上层清液。将含有苏丹II的月见草油按1.2.1和1.2.2的方法制备含苏丹II的微乳及微乳冻干粉。加水将微乳冻干粉复原,分别测定破乳前后样品中苏丹II的总浓度(C_0)和被包封的苏丹II的浓度(C_1),按下式计算微乳中对苏丹II的包封率(EE)。

$$EE / \% = C_1 / C_0 \times 100\%$$

1.2.7 粒径的测定

将样品稀释10倍后放入马尔文粒径分析仪中进行自动测量。参数设定:散射角90°,吸光度值0.010,粘度(cP)0.8872,分散相为水。

2 结果与讨论

2.1 冻干保护剂对微乳冻干粉外观形态的影响

表1 月见草油微乳冻干粉的外观状态

Table 1 The appearance of freeze drying powder

	保护剂:油相	比例	冻干粉外观状态
1	甘露醇:月见草油	8:1	白色针状结构
2	甘氨酸:月见草油	8:1	乳白色网状结构
3	海藻糖:月见草油	8:1	乳白色,蜂窝状
4	乳糖:月见草油	8:1	结块成饼,蜂窝状

外观形态好的冻干制品应为白色、蓬松、饼状的结构,其结构紧密但有蓬松感,无萎缩及塌陷现象,其体积较冻干前基本无变化。分别以甘露醇,乳糖,海藻糖和甘氨酸为保护剂,这四种保护剂都为结晶型的,在冻干过程中水分会升华,其余的乳化剂和油滴会均匀的分散在保护剂结晶的空隙中,这也有利于再复原时液滴的快速分散。试验中按体系中月见草油量

的 8 倍添加, 所制备的微乳冻干粉状态如表 1 所示。

由表 1 可知, 同样的添加倍数下, D-海藻糖保护剂的冻干粉外观形态最差, 乳糖, 蔗糖次之, 以甘露醇为冻干保护剂的冻干粉外观形态好。这可能是因为甘露醇的结晶为羽毛状, 乳滴分散在结晶的片层之间, 因此得到外观较好的冻干制品。甘露醇的添加量越大, 产生的结晶空隙更多, 因此乳滴分散更均匀, 冻干效果越好。

将不同配方的月见草油微乳冻干粉在扫描电镜下观察冻干样品的表面形态和内部结构, 扫描电镜照片如图 1。

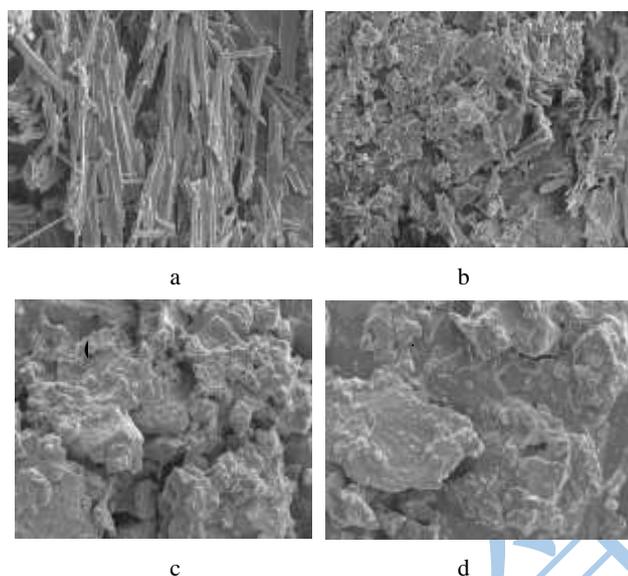


图 1 微乳冻干粉的扫描电子显微镜图像

Fig.1 Scanning electron microscopic of freeze-drying microemulsion

注: a: 甘氨酸为冻干保护剂; b: 甘露醇为冻干保护剂; c: 乳糖为冻干保护剂; d: 海藻糖为冻干保护剂。

扫描电子显微镜可以观察到冷冻干燥样品的微观形态, 通过扫描电镜图像显示, 以甘氨酸作保护剂的微乳冻干粉呈针状结构, 纤维状, 分散比较均匀, 但冻干粉外观不够平滑。而以乳糖和海藻糖为保护剂的样品呈层状或饼状结构, 粘合在一起, 呈不规则形状, 所对应的冻干粉也呈蜂窝状, 无明显的颗粒状。甘露醇作保护剂的冻干粉在外观上呈细小白色针状结晶, 在电镜图像中甘露醇呈现较松散状, 起到了支撑作用, 所形成的空间结构便于乳滴的分散。

2.2 微乳冻干粉再分散性的考察

复水性好的冻干粉, 复水速度快, 形成的乳液均一稳定。试验中将冻干粉加水复水至冻干前原浓度, 在磁力搅拌器上混合, 观察复溶速度。结果如图 2 所示。

如图 2 所示, 相同倍数的不同种冻干保护剂制得的冻干粉, 以海藻糖为冻干保护剂的冻干粉复水最快, 乳糖最慢, 这与保护剂本身的溶解速度有关。这四种保护剂在水溶液中的溶解速度为海藻糖>甘露醇>甘氨酸>乳糖, 这也与它们的复溶速度一致。但复溶后粒径明显变大, 以甘氨酸和海藻糖的粒径最大。随着粒径的增大乳液的稳定性下降, 因此综合两项指标以甘露醇为冻干保护剂。

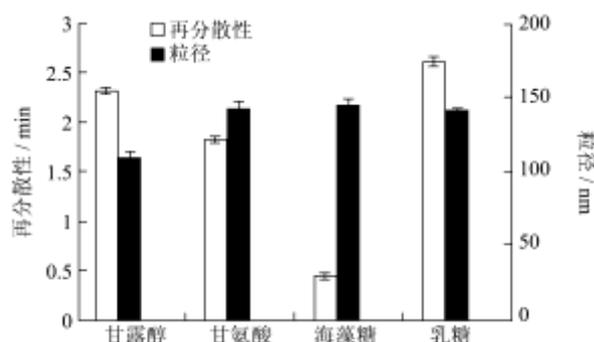


图 2 冻干保护剂对微乳冻干粉再分散性的影响

Fig.2 Redispersion time of microemulsions with different cryoprotectants

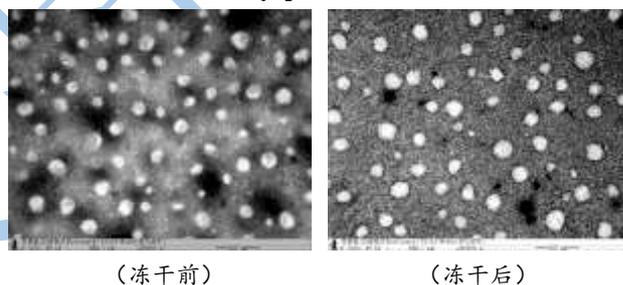


图 3 以甘露醇为冻干保护剂的微乳冻干粉冻干前后透射电镜图(放大倍数 200000)

Fig.3 Electro-microscopic images of freeze-drying microemulsion with mannitol

将添加甘露醇的微乳和冻干粉用水复溶后的液体分别稀释 100 倍, 置于透射电镜下观察。图 3 中可以看到冻干前后微乳的粒子均呈现圆形, 粒子分布比较均一, 复原后的微乳液的粒子尺寸明显大于冻干前的, 这也与马尔文粒径分析仪测定的结果相一致。

2.3 微乳冻干粉的 DSC 分析

DSC 可以测定多种热力学和动力学参数, 也可用来表征混合物各组分相互作用构。将空白微乳冻干粉、和包封苏丹 II 的微乳冻干粉和冻干粉中含有的苏丹 II, 甘露醇进行 DSC 扫描, 结果如图 4。

如图 4 中单体苏丹 II, 甘露醇分别在 165 °C, 175 °C 处有吸热峰, 但在 B、D 两种冻干粉中甘露醇的特征峰消失, 产生了一个新的峰, 而且峰值明显变

小, 说明体系中各成分相互作用会影响相变温度。由于晶体的结晶程度不同熔化温度范围也不同^[4], B、D 两种冻干粉的吸热峰基本重合, 说明苏丹 II 的加入对微乳冻干粉的热性能没有影响, 苏丹 II 基本以无定形形式存在于冻干粉中。

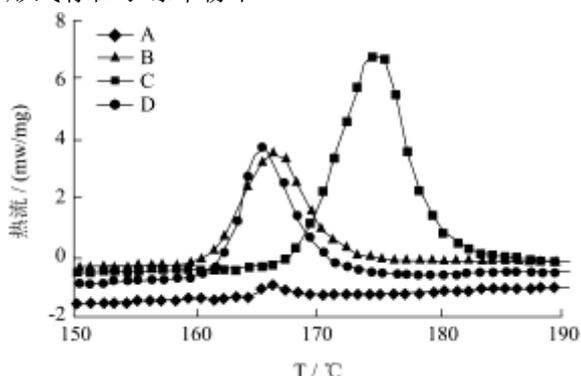


图 4 微乳冻干粉的 DSC 曲线

Fig.4 DSC thermograms of lyophilized powder of microemulsion

注: A: 苏丹 II; B: 空白微乳冻干粉; C: 甘露醇; D: 含苏丹 II 冻干粉。

2.4 微乳冻干粉稳定性考察

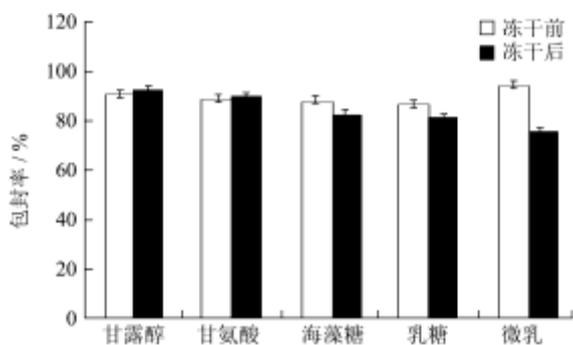


图 5 微乳冻干前后包封率变化

Fig.5 Entrapment efficiency change before and after frozen-dried

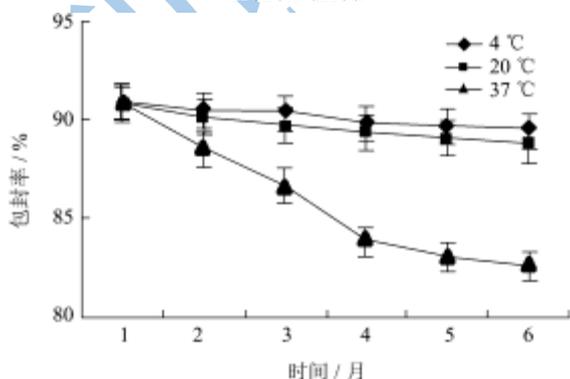


图 6 贮藏条件对微乳冻干粉包封率的影响

Fig.6 Change of entrapment efficiency after 40 days at different temperatures

冷冻干燥对微乳的形态内部结构一定会造成影响, 试验中在 6:1 的月见草油空白微乳中加入苏丹 II, 以甘露醇为冻干保护剂(按油相的 8 倍添加)制备冻干粉。对其冻干前后的包封率进行测定, 结果如图 5。将微乳冻干粉分别在 4 °C, 20 °C 及 37 °C 贮存 6 个月, 考察贮存温度、时间对微乳包封率的影响。结果如图 6 所示。

图 5 中“微乳”列表示未加冻干保护剂的微乳冻融前后的包封率, 对比结果可知添加冻干保护剂后(但未进行冷冻干燥)微乳的包封率下降了, 这是由于保护剂的加入对微乳的结构产生了影响, 即降低了界面膜稳定性, 使其包裹的物质产生泄漏。冻干后微乳的包封率与未加冻干保护剂的微乳相比都有很大的提高, 以甘露醇为冻干保护剂的微乳冻干后包封率最高, 与冻干前相近。说明了冻干过程中冻干保护剂对微乳的结构起到了保护与支撑的作用, 加水复原时有助于微乳结构中界面膜的形成。包封效果还与粒子的大小有关, 粒径在 100 nm 左右时, 包封率最好, 或大或小都会影响载体的包封率。因此冻干保护剂种类和含量不同对微乳的粒径影响不一样, 导致了包封率的差异。

图 6 显示, 冻干粉在冷藏(4 °C)和室温下(20 °C), 37 °C 贮存 6 个月后, 微乳包封率分别从原来的 $90.92 \pm 0.79\%$ 降为 $89.50 \pm 0.76\%$ 、 $88.80 \pm 0.98\%$ 、 $82.58 \pm 0.66\%$ 。说明冻干粉在 37 °C 下放置时体系不稳定苏丹 II 泄漏比较明显; 4 °C 和 20 °C 条件下下降较少, 二者差别不明显。因此制备的微乳冻干粉可以在室温下贮存。

3 结论

3.1 比较了不同对冻干保护剂的种类对微乳的冻干特性及稳定性的影响。以甘露醇为冻干保护剂制备的微乳冻干粉, 呈现均匀的白色针状结构, 复水性较好, 与冻干前相比, 粒径有所增大, 冻干粉的性质稳定, 包封率较高, 不需冷藏, 在室温下贮存 6 个月无明显变化。

3.2 冻干保护剂能够保护微乳在冷冻干燥过程中乳滴的融合, 降低冰晶对微乳液的损伤, 但是冻干保护剂的加入一定程度上破坏了微乳的结构导致其包封率下降。因此在微乳的冷冻干燥过程中冻干保护剂是十分重要的。

参考文献

[1] Leser ME, Sagalowicz L, Michel M, et al. Self-assembly of polar food lipids [J]. Advances in Colloid and Interface

- Science. 2006, 123: 125-136
- [2] Crowe L, Crowe J. Stabilization of dry liposomes by carbohydrates [J]. *Developments in Biological Standardization*, 1991, 74: 285-294
- [3] Phan T, Attaphong C, Sabatini D. Effect of extended surfactant structure on interfacial tension and microemulsion formation with triglycerides [J]. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2011, 88(8): 1223-1228
- [4] Szumala P, Szeląg H. Water solubilization using nonionic surfactants from renewable sources in microemulsion systems [J]. *Journal of Surfactants and Detergents*, 2012, 15(4): 485-494
- [5] Sanguansri L, Augustin MA. Microencapsulation and delivery of omega-3 fatty acids [J]. *Functional Food Ingredients and Nutraceuticals: Processing Technologies*, 2006: 297
- [6] Dolly P, Anishparvin A, Joseph G, et al. Microencapsulation of *Lacto-bacillus plantarum* (mtcc 5422) by spray-freeze-drying method and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions [J]. *Journal of Microencapsulation*, 2011, 28(6): 568-574
- [7] Pillai DS, Prabhasankar P, Jena B, et al. Microencapsulation of *Garcinia cowa* fruit extract and effect of its use on pasta process and quality [J]. *International Journal of Food Properties*, 2012, 15(3): 590-604.
- [8] Shahgaldian P, Gualbert J, Assa K S, et al. A study of the freeze-drying conditions of calixarene based solid lipid nanoparticles [J]. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2003, 55(2): 181-184
- [9] Cavalli R, Caputo O, Carlotti M E, et al. Sterilization and freeze-drying of drug-free and drug-loaded solid lipid nanoparticles [J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 1997, 148(1): 47-54
- [10] Zhang L, Liu L, Qian Y, et al. The effects of cryoprotectants on the freeze-drying of ibuprofen-loaded solid lipid microparticles (SLM) [J]. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2008, 69(2): 750-759
- [11] Youngren SR, Mulik R, Jun B, et al. Freeze-dried targeted mannosylated selenium-loaded nanoliposomes: development and evaluation [J]. *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, 2013, 14(3): 1012-1024
- [12] Karthik P, Anandharamakrishnan C. Microencapsulation of docosahexaenoic acid by spray-freeze-drying method and comparison of its stability with spray-drying and freeze-drying methods [J]. *Food and Bioprocess Technology*, 2013, 6(10): 2780-2790
- [13] 李欣. 多西紫杉醇静脉注射亚微乳的研究[D]. 军事医学科学院博士学位论文, 2007, 4
- LI Xin. Study on docetaxel submicroemulsion for intravenous injection [D]. PhD Dissertation of Military Medical Sciences, 2007, 4
- [14] Hou D, Xie C, Huang K, Zhu C. The production and characteristics of solid lipid nanoparticles (SLNs) [J]. *Biomaterials*, 2003, 24(10): 1781-1785