真空冷冻干燥微藻 DHA 油纳米乳工艺研究

刘维维^{1,2}, 吴 鹏², 王昭凯², 林祥志²

(1. 福建农林大学 食品科学学院, 福建 福州 350000; 2. 国家海洋局 第三海洋研究所, 福建 厦门 361005)

摘要:采用超声波法制备微藻 DHA 油纳米乳,研究了微藻 DHA 油纳米乳真空冷冻干燥工艺,并对其粉末进行了表征。研究结果表明,当冻干曲线为:预冻:-40℃维持 2 h,真空度为 0.2 mbar;升华干燥:-30℃维持 12 h,真空度为 0.2 mbar, -20℃维持 2.5 h,真空度为 0.15 mbar;解析干燥:25℃维持 3 h,真空度为 0.15 mbar, 且油相与冻干保护剂的质量比为 1:4,冻干保护剂选择葡萄糖:甘露醇质量比为 1:3 时,制备的纳米乳粉 末颗粒外观呈乳白色、均匀细腻,复溶速度在 10s 内,冻干前粒径为(175.6±22.1)nm,多分散系数(PDI)为 (0.15±0.62),冻干后粒径为(211.1±23.5)nm, PDI 为(0.152±0.116),差异不大,依旧在纳米范围内,不仅保证 了 DHA 的长期稳定性,还扩大了 DHA 的应用范围,有望成为 DHA 的新型纳米载药系统。

关键词: 微藻 DHA 油; 纳米乳; 真空冷冻千燥 中图分类号: TS22 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2017)04-0051-06 DOI: 10.11759/hykx20160311001

DHA 是二十二碳六烯酸ω-3 系多不饱和脂肪酸 (ω-3 polyunsaturated fatty acid, ω-3 PUFA)^[1],由于其含 有 6 个不饱和双键,因此对人类健康具有多种特殊生 理功能^[2]。纳米乳是一种平均粒径在纳米级,半透明状 的乳液^[3]。作为一种新型给药传输系统,由于其制备方 法简单,稳定性高和生物利用率高而受到广泛关注^[4]。 DHA 是脂溶性物质,不溶于水,易氧化,应用困难,采 用纳米技术将微藻 DHA 油制备成水包油型纳米乳,可 大幅度缓解氧化速度,并提高 DHA 的生物利用率^[5]。

纳米乳是热力学不稳定体系^[6],长期放置可能 会发生破裂、分层、絮凝或合并等理化现象,影响纳 米乳的稳定性。当前较为普遍的解决办法是采用真 空冷冻干燥法(简称冻干法)^[7]将纳米乳冻干成为干 乳剂,从生产实际上解决了纳米乳剂保存不稳定的 问题,如前列地尔干乳剂、紫杉醇干乳剂。常见的脂 肪乳配方并不适用于制成冻干产品,普通的冻干工 艺也无法有效保证乳剂在冻干过程中的稳定性和完 整性,因此,良好的纳米冻干制剂需要对乳剂的配 方、干乳剂制备工艺参数和冻干工艺参数进行全面 系统的研究。本文采用真空冷冻干燥法制备微藻 DHA 油纳米乳粉末,考察冻干过程中重要的影响因 素,优化冻干工艺,扩大 DHA 的应用范围。

- 1 材料与方法
- 1.1 材料与设备

微藻 DHA 油(武汉嘉必优生物工程有限公司);

聚氧乙烯氢化蓖麻油(RH40)(德国巴斯夫公司);甘 露醇;海藻糖;葡萄糖,以上试剂均为分析纯,水为 蒸馏水。

KQ-300DE 超声波细胞破碎仪(成都一科仪器设备有限公司); Zetasizer Nano ZS 电位粒度仪(英国马尔文仪器有限公司); TECNAI F30 场发射透射电镜 (荷兰 FEI 公司); Telstar ly-25 真空冷冻干燥机(西班 牙泰事达公司)。涡旋振荡器(德国 IKA 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 微藻 DHA 油纳米乳的制备

以微藻 DHA 油作油相, 聚氧乙烯氢化蓖麻油 (RH40)作表面活性剂, 蒸馏水作水相制备微藻 DHA 油纳米乳。制备纳米乳溶液 25 mL, 其中油相含量为 7.5%, 表面活性剂含量为 1.5%, 其余为水相, 放入 超声波探头仪中超声处理。得到均一稳定、流动性 良好的乳白色微藻 DHA 油水包油型纳米乳。为了防

收稿日期: 2016-03-11; 修回日期: 2016-09-10

基金项目: 厦门南方海洋研究中心项目 (No. 14CZP028HJ02); 国家自 然科学基金项目(No. 41476148); 海洋经济创新发展区域示范项目 (12PYY001SF08)

[[]Foundation: Xiamen Southern Oceaographic Center, No.14CZP028HJ02; National Natural Science Foundation of China, No.41476148; Marine economy innovation development area demonstration project, No.12PYY001SF08] 作者简介:刘维维(1989-),女,新疆库尔勒人,硕士研究生,研究方 向:农产品加工及贮藏工程,电话: 15606928959, E-mail: 1394022216@qq.com;林祥志,通信作者,研究员,博士生导师 E-mial: xzlin@tio.org.cn

止超声探头产生的热量对混合溶液的物化性能的影响,整个实验操作在低温下进行。将微藻 DHA 油纳 米乳稀释 300 倍,在常温下,置于电位粒度仪样品池 中,检测纳米乳粒径及多分散系数。所得微藻 DHA 油纳米乳平均粒径为(175.6±22.1)nm,多分散系数 (PDI)为(0.15±0.62)。

1.2.2 微藻 DHA 油纳米乳冻干制品的制备

取1mL1.2.1制备的纳米乳液于10mL西林瓶中, 按照一定的油相和冻干保护剂的质量比添加冻干保 护剂,充分溶解。将此混合液置于真空冷冻干燥机中, 寻找合适的冻干曲线,进行真空冷冻干燥。

1.2.3 冻干曲线的绘制

冻干曲线是真空冷冻干燥过程中温度、压力与 时间之间的关系曲线^[8]。在真空冷冻干燥的过程中, 全面掌握冻干产品和冻干机每一阶段的各项参数是 得到优质冻干产品的基础。冻干曲线不仅是手工操 作真空冷冻干机的依据,同时也是自动控制冻干机 操作的保障。整个冻干过程包括三个阶段,分别是预 冻、升华干燥、解析干燥。在纳米乳液放入冻干机 时,将电极浸入到乳剂中,通过观察乳剂和冻干机 各项参数的实时动态来绘制微藻DHA油纳米乳的冻 干曲线。

冻干曲线的绘制包括很多因素,主要有预冻温 度、最低共晶点、升华干燥和解析干燥阶段的温度 及时间等。

最低共晶点温度是指整个纳米乳制品中所有水 分完全冻结成冰晶时的温度。在升华干燥阶段,冻干 制品应该保证其完全处于冰晶状态,冻干制品的温 度应始终低于最低共晶点,所以,需对微藻 DHA 油 纳米乳剂与冻干保护剂的最低共晶点进行测定^[9]。采 用电阻法测定乳剂最低共晶点,将电极浸入乳剂中, 将乳剂冻结成固体,液态电阻低,固态电阻高,样品 的电阻会由最低点急剧升至最高点。电极可以实时 监测样品的温度和电阻,从而找到最低共晶点。冻干 制品电阻和冻干制品温度的交点即为最低共晶点。

升华干燥的时间关乎整个冻干过程的成败,影响因素较多,但主要影响因素为制品的分装厚度。当冰晶体简单且厚度小于 10 mm 时,标准干燥时间一般在 10~30 h 之间,可按照下面公式(1)计算:

T=*K*^{1.5} (1) 式中, *T* 为时间, 单位为 h; *K* 为冻干制品厚度, 单位 为 mm。

精密量取 1 mL 微藻 DHA 油纳米乳装入 10 mL

西林瓶中,添加适量冻干保护剂,涡旋振荡至冻干 保护剂完全溶解,放入真空冷冻干燥机进行冻干。先 根据微藻 DHA 油纳米乳冻干样品的具体情况预设一 条冻干曲线,其程序为:预冻: -50℃维持 3 h,真空 度为 0.2 mbar;升华干燥: -30℃维持 11 h,真空度为 0.2 mbar;解析干燥: 25℃维持 3 h,真空度为 0.15 mbar, 即为真空冷冻干燥过程的理论曲线。冻干结束后观 察样品的冻干曲线,分析找到最适合的冻干曲线, 最终优化冻干工艺。

1.2.4 冻干保护剂配方的筛选

纳米乳液在冷冻干燥过程中需要加入一定量的 冻干保护剂(支撑剂),当连续相的水分子被升华除 去后,冻干保护剂起着骨架作用,使得纳米颗粒不会 塌陷,皱缩。当加入水相时,支撑剂迅速溶解于连续相, 使乳剂恢复原有的状态。冷冻干燥的冻干保护剂可分 为结晶型和非结晶型^[10]。本文对甘露醇、葡萄糖和海 藻糖等常用的冻干保护剂进行比较研究,以纳米颗粒 的外观、重分散性和复溶后乳剂的平均粒径为指标,考 察不同冻干保护剂对纳米乳物理性能的影响。

将冻干保护剂分成三组配方:(1)葡萄糖;(2)葡 萄糖和甘露醇;(3)海藻糖和甘露醇,按照油相:冻干 保护剂=1:4、1:10、1:15、1:20的质量比分别 添加冻干保护剂,并以不添加任何冻干保护剂的纳 米乳液作为空白对照组。将添加了冻干保护剂的纳 米乳液涡旋振荡至冻干保护剂完全溶解,待其冻干 后进行效果评价,主要是形貌和复溶后平均粒径的 变化。在此基础上明确冻干保护剂的最佳组合,优化 冻干保护剂配方。

2 结果与分析

2.1 冻干曲线的优化

如图 1 所示, 在预冻阶段, 冻干制品的温度处于 直线下降状态, 直至降到-40℃时, 制品温度基本保 持不变。由此说明微藻 DHA 油纳米乳在-40℃时已 经完全从液态变成固态, 即预冻温度设为-40℃。一 般来说, 预冻温度如果过高, 不能将制品完全冻住, 在真空冷冻干燥时会有部分液体沸腾, 造成制品表 面参差不齐, 粗糙杂乱, 这主要是由于机械效应和 溶质效应^[11]。代表冻干制品电阻的线条和代表冻干 制品温度的线条有一交点, 即为最低共晶点, 此时 的温度在-18℃左右, 即最低共晶点为-18℃。

升华干燥为了将样品中游离水直接由固态变为 气态,冷凝器收集这些气态,将它们变为液态除去。 这个过程需要吸收热量,故要升高温度,但不能高 于最低共熔点,此过程可除去 90%水分,温度大概 低于最低共晶点 10℃,而从图 1 可以得出最低共晶 点在--18℃左右,故升华阶段温度选择--30℃是合理 的。由公式(1)和样品分装厚度估算得知,升华干燥 阶段的时间在 10~20 h内比较合理。

解析干燥为了除去样品中结合水及吸附于干燥 层中的水^[12],需要足够的热量,温度可大幅升高至允 许的最高温度以下,其值一般为室温至 40℃之间,解 析干燥阶段温度设为 25℃比较合理、时间不宜过长。





此外,从图1可以看出,样品在进入解析干燥时 发生了熔融现象,造成样品电阻大幅下降。微藻 DHA 油纳米乳液是混合物,没有固定熔点,在冻干 的过程中随着冻干制品内部结构状态的改变,熔点 也在不断发生变化。故升华干燥阶段需要有一个升 温的过程,这使升华干燥和解析干燥之间有一个过 渡的过程,不会使样品中某些未冻住的部分在进入 解析干燥时由于温度升高幅度很大而造成样品沸 腾。故改变冻干曲线为:预冻:-40℃维持2h,真空 度为 0.2 mbar; 升华干燥:-30℃维持12h,真空度为 0.2 mbar, -20℃维持 2.5 h,真空度为 0.15 mbar; 解 析干燥: 25℃维持3 h, 真空度为 0.15 mbar, 即为真 空冷冻干燥过程的理论曲线, 待冻干结束后, 观察 冻干曲线。如图 2 所示, 搁板温度、制品温度和理论 曲线基本重合在一起, 符合冻干规律。





2.2 冻干保护剂配方筛选结果

如表 1 所示, 从外观效果来看, 冻干保护剂对冻 干产品有明显的保护作用。在试验条件下, 当油相 与冻干保护剂质量比为 1:4 时, 冻干微藻 DHA 油 纳米乳外观特征最好; 当油相与冻干保护剂质量比 为 1:15 和 1:20 时, 冻干微藻 DHA 油纳米乳的外 观特征较差, 造成这种现象的原因可能是冻干保护 剂含量过多, 乳剂会过饱和, 从而影响冻干后的外 观特征。结合表 1 和图 3 可知, 当油相与冻干保护剂 的比例为 1:4 时, 可得到外观及平均粒径都较为理 想的微藻 DHA 油纳米乳干颗粒, 且选用甘露醇和海 藻糖、甘露醇和葡萄糖的混合物作为冻干保护剂比 单独使用葡萄糖作为冻干保护剂更能保障微藻 DHA 油纳米乳的冻干效果。因此, 选择油相与冻干保护剂 的比例为 1:4, 以甘露醇和海藻糖的混合物或甘露 醇和葡萄糖的混合物作为冻干保护剂。

表 1 油相和冻干保护剂的比例对冻干微藻 DHA 油纳米乳外观的影响

Tab.1	The impact of the oil and	d freeze-drving prote	ctant ratio on the appea	rance of DHA oil nanoe	nulsion after lyophilization
	The impact of the on an		count rand on the appea		indision differ i jopininisation

达 工 促 拉 刻		穴白			
	1:4	1:10	1:15	1:20	<u>т</u> н
葡萄糖	В	В	В	D	
甘露醇和葡萄糖	А	D	D	С	D
甘露醇和海藻糖	А	С	С	С	

注: A. 乳白色, 均匀细腻, 光滑平整; B. 瓶内壁裹着一层乳白色物质, 与瓶中间干乳粉分离, 冻干后的乳剂量明显减少; C. 乳白色, 明显断层, 疏松多孔, 粗糙杂乱; D. 黏稠状, 淡油黄色



图 3 不同含量冻干保护剂对冻干后微藻 DHA 油纳米乳 平均粒径的影响

Fig.3 The impact of different contents of freeze-drying protective additives on the average particle size of microalgae DHA oil nanoemulsion after lyophilization

1:15和1:20两组只加葡萄糖组冻干后无法复溶,无检测结果。 The 1:15 and 1:20 groups with glucose cannot be dissolved after freeze-drying, no results



图 4 冻干保护剂之间不同比例对微藻 DHA 油纳米乳粒 径的影响

Fig.4 The impact of different ratios of freeze-drying protective additives on the average particle size of microalgae DHA oil nanoemulsion

由于葡萄糖不易冻干,故不单独使用葡萄糖作 为冻干保护剂或者添加较多葡萄糖。不同冻干保护 剂比例对冻干微藻 DHA 油纳米乳粒径的影响如图 4 所示,从图中可知,当葡萄糖:甘露醇质量比为 1:3 时,冻干微藻 DHA 油纳米乳的粒径与冻干前的粒径 基本没有变化;而在其他冻干保护剂比例时,冻干 微藻 DHA 油纳米乳的粒径较冻干前则有明显的增 大。因此,在试验条件下,最佳的冻干保护剂及比例 为:葡萄糖:甘露醇为 1:3。

综上所述, 冻干微藻 DHA 油纳米乳的最佳条件 为:油相与冻干保护剂的比例为 1:4, 冻干保护剂 选择葡萄糖:甘露醇为 1:3。

2.3 微藻 DHA 油纳米乳冻干粉表征

冻干后的微藻 DHA 油纳米乳呈乳白色干颗粒, 无微藻 DHA 油的腥味,复溶速度快。将其加水复溶 后用透射电镜(TEM)观察其内部形态,发现纳米颗 粒冻干后平均粒径及形态均没有明显变化,用电位 粒度仪检测其平均粒径为(211.1±23.5)nm,PDI 为 (0.152±0.116),均匀的分散在水相中,见图 5。

3 讨论

本实验通过高能乳化法中的超声波法制得微藻 DHA 油纳米乳。为了提高其稳定性,根据微藻 DHA 油纳米乳的配方及其性质,添加冻干保护剂,设计 冻干曲线,最终可以得到不坍塌,不结块,不皱缩, 表面平滑,均匀乳白色的纳米粉体。冻干后粒径为 (211.1±23.5)nm, PDI 为(0.152±0.116),仍维持在纳米 范围内,不仅提高了 DHA 的消化吸收率,还保障了 其长期稳定性。

纳米乳在冷冻干燥阶段其浓度逐渐增大,会引 起纳米粒子的聚合,甚至是不可逆的合并。此外,逐 渐增大的冰晶对纳米乳产生机械压力,破坏其稳定 性。所以,在冷冻干燥之前添加冻干保护剂可以提高



图 5 微藻 DHA 油纳米乳冻干粉外观图(a)及 TEM 图(b) Fig.5 The appearance (a) and TEM image (b) of microalgae DHA oil nanoemulsion lyophilized powder

纳米乳的稳定性^[13-14]。海藻糖、蔗糖、乳糖、葡萄 糖和甘露醇等由于其在玻璃化转变温度时具有玻璃 化状态,因而常用作冻干保护剂^[15]。

升华干燥是真空冷冻干燥的关键,本实验将升 华干燥阶段分为两部分,可以有效的避免由于制品 不均一或者浓度过大而引起的制品上下有温差,制 品下部的结晶不是从固体升华成为气体,而是从固 体转变为液体再到气体蒸发,形成表面凹凸不平的 现象^[16]。在升华干燥的结束阶段,会形成均匀致密的 小孔,这些小孔就是在预冻阶段形成的冰晶体升华 所留下的^[17]。

参考文献:

[1] 彭全材,宋金明,张全斌,等.四种绿藻和四种褐藻
 脂肪酸组成的比较研究[J].海洋科学,2014,38(4):
 27-33.

Peng Quancai, Song Jinming, Zhang Quanbin, et al. Comparative study on fatty acid composition of four kinds of green algae and brown alga[J]. Marine Sciences, 2014, 38(4): 27-33.

- [2] 王一兵,柯珂,张荣灿. 马尾藻多不饱和脂肪酸提取、 分离及成分分析[J]. 海洋科学, 2014, 38(7): 57-62.
 Wang Yibing, Ke Ke, Zhang Rongcan. Extraction, separation and analysis of polyunsaturated fatty acids in sargassum[J]. Marine Sciences, 2014, 38(7): 57-62.
- [3] Mason T G, Wilking J N, Meleson K, et al. Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties[J]. Journal of Physics Condensed Matter, 2006, 19(7): 635-666.
- [4] Mcclements D J. Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance[J]. Soft Matter, 2011, 7(6): 2297-2316.
- [5] Walker R M, Decker E A, Mcclements D J. Physical and oxidative stability of fish oil nanoemulsions produced by spontaneous emulsification: Effect of surfactant concentration and particle size[J]. Journal of Food Engineering, 2015, 164: 10-20.
- [6] Nicolas A, Jean-Pierre B, Patrick S. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates-a review[J]. Journal of Controlled Release, 2008, 128(3): 185-199.
- [7] 李超峰, 邹晓兰, 于艳卿, 等. 加工工艺对刺参体壁 氨基酸和脂肪酸的影响[J]. 海洋科学, 2012, 36(1): 42-48.

Li Chaofeng, Zou Xiaolan, Yu Yanqing, et al. Effects of Processing Technology on Amino Acids and Fatty Acids in body-wall of oplopanax elatus[J]. Marine Sciences, 2012, 36(1): 42-48.

- [8] 王洁,黄传伟,安源,等. 真空冷冻干燥的工艺流程[J]. 医疗卫生装备,2012,33(9):90-91.
 Wang Jie, Huang Chuanwei, An Yuan, et al. Vacuum freeze-drying process[J]. Chinese Medical Equipment Journal, 2012, 33(9): 90-91.
- [9] Kukizaki M, Goto M. Preparation and evaluation of uniformly sized solid lipid microcapsules using membrane emulsification[J]. Colloids & Surfaces A Physicochemical & Engineering Aspects, 2007, 293(s 1–3): 87-94.
- [10] Higashi S, TabataN K, Maeda Y, et al. Size of lipid microdroplets effects results of hepatic arterial chemotherapy with an anticancer agent in water-in-oil-inwater emulsion to hepatocellular carcinoma.[J]. Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics, 1999, 289(2): 816-819.
- [11] Sugiura S, Nakajima M, Yamamoto K, et al. Preparation characteristics ofwater-in-oil-in-water multiple emulsions using microchannelemulsification[J]. Journal of Colloid & Interface Science, 2004, 270(1): 221-228.
- [12] Pikal M J, Shah S, Roy M L, et al. The secondary drying stage of freeze drying: drying kinetics as a function of temperature and chamber pressure[J]. International Journal of Pharmaceutics, 1990, 60(3): 203-207.
- [13] Wassim A, Ghania D, Serge S, et al. Freeze-drying of nanoparticles: formulation, process and storage considerations[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2006, 58(15): 1688-1713.
- [14] D Julian M. Theoretical analysis of factors affecting the formation and stability of multilayered colloidal dispersions[J]. Langmuir, 2005, 21(21): 9777-9785.
- [15] Liuquan Lucy C, Deanna S, Joanna S, et al. Mechanism of protein stabilization by sugars during freeze-drying and storage: native structure preservation, specific interaction, and/or immobilization in a glassy matrix?[J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2011, 36(2): 267-275.
- [16] 郭树国. 人参真空冷冻干燥工艺参数实验研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2012.
 Guo Shuguo. Experiment study on technology parameters for freeze-drying of ginseng slice[D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2012.
- [17] Williams N A, Polli G P. The lyophilization of pharmaceuticals: a literature review.[J]. Journal ofParenteral Science & Technology A Publication of the Parenteral Drug Association, 1984, 38(2): 48-59.

Study on the vacuum freeze-drying process on microalgae oil nanoemulsion powder

LIU Wei-wei^{1, 2}, WU Peng², WANG Zhao-kai², LIN Xiang-zhi²

(1. College of Food Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350000, China; 2. Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Xiamen 361005, China)

Received: Mar. 11, 2016

Key words: microalgae DHA oil; nanoemulsion; vacuum freeze-drying

Abstract: This study explores the vacuum freeze-drying process and characterizes microalgae DHA oil nanoemulsion nanopowder, which is synthesized via ultrasonic. Result shows that the nanopowder is milky white and delicate with a constant dissolution rate of 10 s under the following conditions of the freeze-drying curve with oil phase to freeze-drying protective additive ratio of 1 : 4 and glucose to mannitol ratio of 1 : 3: (1) Pre-freezing at -40° C for 2 h under 0.2 mbar pressure; (2) Sublimation drying at -30° C for 12 h under 0.2 mbar pressure followed by drying at -20° C under 0.15 mbar pressure for 2.5 h; (3) Analytical drying at 25°C for 3 h under 0.15 mbar pressure. Before freeze-drying, the particle size and polydispersity coefficient were (175.6±2.1) and (0.15±0.62) nm, respectively, and these values changed to (211.1±23.5) and (0.152±0.116), respectively, after freeze-drying, indicating that the difference between these values is small and in the range of nanometers. The vacuum freeze-drying technology not only ensures the long-term stability of DHA but also expands the scope of its application. DHA is therefore expected to become a new nano-loaded drug system.

(本文编辑:康亦兼)