

溶剂替换法制备 β -胡萝卜素纳米粒子与稳定性*

殷丽君¹ 韩清华² 刘海杰¹ 王晓辉³ 李里特¹

(1. 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083; 2. 中国农业机械化科学研究院, 北京 100083;
3. 郑州轻工业学院材料与化学工程学院, 郑州 450002)

【摘要】 采用溶剂替换法制备 β -胡萝卜素纳米粒子,通过考察4种乳化剂对制备纳米粒子粒径及分布的影响和测定贮藏过程中粒子粒径和 β -胡萝卜素含量变化,研究了其稳定性。试验结果表明:以酪蛋白钠为乳化剂制备的 β -胡萝卜素纳米粒子粒径大于以Tween 20、蔗糖脂肪酸酯和月桂酸十甘油酯为乳化剂制备的纳米粒子;向蔗糖脂肪酸酯中添加酪蛋白钠,以此混合物作为乳化剂可以制备平均粒径小于50 nm的 β -胡萝卜素纳米粒子;贮藏过程中,所有乳化剂制备的 β -胡萝卜素纳米粒子粒径均保持较好的稳定性, β -胡萝卜素含量随着贮藏时间延长而减小,特别是在Tween 20为乳化剂制备的纳米粒子中降解最为明显。

关键词: β -胡萝卜素 纳米粒子 粒径 分布 溶剂替换 稳定性

中图分类号: TS201.1 文献标识码: A

Preparation of β -carotene Nanodispersions by Solvent Displacement Technique and Their Stability

Yin Lijun¹ Han Qinghua² Liu Haijie¹ Wang Xiaohui³ Li Lite¹

(1. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China

2. Chinese Academy of Agricultural Mechanization Sciences, Beijing 100083, China

3. College of Material Science and Chemical Engineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450002, China)

Abstract

Effect of four different emulsifiers on the physicochemical properties and stability of β -carotene nanoparticles in oil-in-water dispersions produced by a solvent displacement technique were examined. The β in carotene particle size was measured, and the stability and retention of β -carotene during storage were determined by HPLC. The particle size of β -carotene nanodispersions stabilized by sodium caseinate (SC) was generally larger than that in the presence of Tween 20, sucrose fatty acid ester (SE) or decaglycerol monolaurate (ML750). The addition of SE or ML750 could increase the ability of sodium caseinate to stabilize β -carotene particle formation. It is suggested that sodium caseinate can be useful to partly replace SE as emulsifiers in the preparation of β -carotene nanodispersions with less than 50 nm mean diameter. During storage at 4°C, although the β -carotene content in the nanodispersions showed a significant decrease with increasing storage period, especially in the case of Tween 20 as emulsifiers, the size distribution was almost unchanged in all prepared β -carotene nanodispersions.

Key words β -carotene, Nano dispersions, Particle diameter, Distribution, Solvent displacement, Stability

引言

β -胡萝卜素是一种广泛存在于植物和果实中的

脂溶性活性营养成分。然而, β -胡萝卜素的低水溶性不仅限制了其在食品和药品中的应用,也降低了其生物活性^[1]。纳米技术的发展为提高 β -胡萝卜素

成分的水溶解性和提高 β -胡萝卜素生物活性提供了可能。

目前,制备纳米粒子有很多方法,例如:乳化分散技术、液中干燥技术、溶剂替换技术和沉淀方法等。溶剂替换技术是一种制备包含水不溶性活性成分纳米粒子的方法。在这个方法中,脂溶性活性成分首先溶于包含有水胶素的有机溶剂中,如甲醇和丙酮,将此溶剂缓慢滴入含有乳化剂的水相中,纳米粒子即在有机溶剂的快速分散过程中形成^[2-3],然后真空挥发去除乳状液中挥发性溶剂。在此过程中,乳化粒子中活性成分发生沉淀和结晶作用,从而转化为纳米粒子。溶剂替换方法是一种简单、快速和低能量消耗的纳米粒子制备技术。

食品工业中经常使用很多乳化剂,以这些乳化剂生产的乳状液往往有不同的粒径、分布及特性。本文以 Tween 20、酪蛋白钠、蔗糖脂肪酸酯和月桂酸十甘油酯作为乳化剂,采用溶剂替换技术,制备 β -胡萝卜素的纳米分散液,研究这些乳化剂对制备的粒子粒径的影响,并探讨制得的纳米粒子分散液的粒子稳定性及粒子中 β -胡萝卜素含量的稳定性。

1 实验材料和方法

1.1 实验材料

β -胡萝卜素(分析纯), Tween 20, 酪蛋白钠(sodium caseinate, 简称 SC):日本 wako 公司, 蔗糖脂肪酸酯(sucrose fatty acid ester, 简称 SE), 月桂酸十甘油酯(decaglycerol monolaurate, ML750):日本 sakamoto 公司, β -胡萝卜素(HPLC 纯):sigma 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 纳米粒子的制备

根据 β -胡萝卜素在丙酮和水相中溶解情况,对 Fessi(1989 年)的纳米沉淀方法进行修订,制备 β -胡萝卜素纳米粒子。以 0.15 g/L 的 β -胡萝卜素丙酮溶液作为有机相,在磁力搅拌下缓慢滴入含有质量分数 1% 乳化剂和质量分数 0.02% 叠氮化钠的 0.05 mol/L 磷酸缓冲液中。有机相与水相的体积比是 1:9, 40℃ 下真空挥发至原体积的 1/5。研究蔗糖脂肪酸酯(SE)、月桂酸十甘油酯(ML750)与酪蛋白钠的不同配比对纳米粒子粒径的影响。

1.2.2 纳米粒子的稳定性研究

将上述制备的纳米粒子分散液分别置于 4℃ 冰箱中存放,3 个月内定期测定纳米粒子粒径的变化和粒子中 β -胡萝卜素含量的变化。

1.2.3 粒径分析

采用 Zetasizer Nano 光分散粒径测定仪测定 β -胡萝卜素纳米粒子的粒径和分布。 β -胡萝卜素和水

的折射指数分别为 1.47 和 1.33。首先用 0.05 mol/L 的磷酸缓冲液稀释样品。粒子吸收值设定为 0.3, 温度为 25℃。测定结果 3 次平均。变异系数计算来自于标准偏差和粒径平均值。

1.2.4 样品制备和 β -胡萝卜素含量的测定

样品制备按文献[4]进行。首先,配制质量浓度为 50 g/L 的 Na_2SO_4 水溶液,然后加入 EDTA,使 EDTA 在 Na_2SO_4 水溶液中的浓度为 1 mmol/L,再将 2.5 g 样品溶解于上述含 EDTA 的 Na_2SO_4 水溶液中。取 1 mL 样品液加到 C18 固相柱的顶端,分别以 10 mL 去离子水、5 mL 体积分数为 10% 的乙醇、以及 10 mL 体积比为 7:3 的乙腈/乙醇的溶液洗脱,收集乙腈/乙醇洗脱液并采用 HPLC 测定。

采用 JASCO 高效液相色谱测定 β -胡萝卜素含量,色谱柱为 4.6 mm × 250 mm, 5 μm 硅胶柱(Daisopak SP-120-5-SIL-P, Daoso Co., Ltd, Osaka, Japan)测定,测定波长 450 nm,流动相为体积比 7:3 的乙腈/乙醇溶液,流速 1.6 mL/min,进样量 30 μL 。

1.2.5 TEM 分析

采用冷冻断裂技术制备样品。断裂样品表面覆盖炭层和铂金。以 JEOL-1010 型透射电镜(JEOL, Tokyo, Japan)进行纳米粒子的形态学观察。

2 结果和讨论

2.1 乳化剂种类对 β -胡萝卜素纳米粒子粒径的影响

以酪蛋白钠、Tween 20、蔗糖脂肪酸酯和月桂酸十甘油酯作为乳化剂制备 β -胡萝卜素纳米粒子,粒径和分布如图 1 和表 1 所示。从图 1 可知,以酪蛋白钠为乳化剂制备的 β -胡萝卜素纳米粒子粒径处于单峰分布,粒子分布变异系数明显小于其他 β -胡萝卜素纳米粒子。但是,与其他的乳化剂比较而言,酪蛋白钠稳定的 β -胡萝卜素纳米粒子粒径较大,平均粒径达到 206 nm。而其他 3 种乳化剂制得的 β -胡萝卜素纳米粒子粒径均小于 50 nm。这些结果反

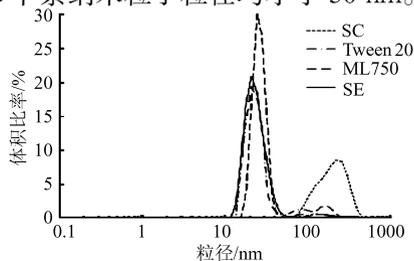


图 1 不同乳化剂制备的 β -胡萝卜素纳米粒子粒径分布
Fig. 1 Particle size distribution of β -carotene nanodispersions prepared with different emulsifiers

映了酪蛋白钠制备 β -胡萝卜素纳米粒子的乳化能力略差于其他3种类型的乳化剂。

表1 不同乳化剂制备的 β -胡萝卜素纳米粒子粒径特性

Tab.1 Characteristics of particle size of β -carotene nanodispersions prepared with different emulsifiers

乳化剂	平均粒径/nm	粒径分布类型	变异系数/%
SC	206.2±15.9	单峰	36.82
Tween 20	30.1±1.5	双峰	83.27
ML750	40.9±0.9	双峰	87.26
SE	32.0±1.3	双峰	138.10

酪蛋白钠、蔗糖脂肪酸酯以及月桂酸十甘油酯均是常用的食品乳化剂,特别是酪蛋白钠作为食品蛋白质在许多食品中起到乳化剂的作用。在国外,许多国家将Tween 20视为非食品用乳化剂,考虑到采用溶剂替换法单独以酪蛋白钠为乳化剂制备的 β -胡萝卜素纳米粒子粒径较大,因此本研究进一步添加蔗糖脂肪酸酯以及月桂酸十甘油酯制备小粒径的 β -胡萝卜素纳米粒子提高酪蛋白钠的乳化性。

2.2 添加蔗糖脂肪酸酯和月桂酸十甘油酯对 β -胡萝卜素纳米粒子粒径的影响

将蔗糖脂肪酸酯和月桂酸十甘油酯分别按照一定质量比添加到酪蛋白钠溶液中,采用溶剂替换法制备 β -胡萝卜素纳米粒子,测定制得样品的粒径分布特性,实验结果如图2、3和表2、3所示。

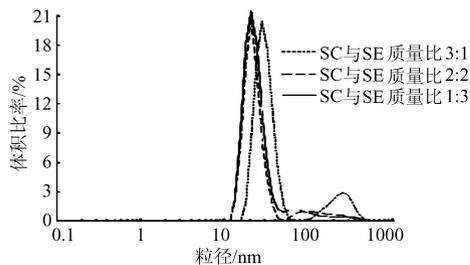


图2 添加蔗糖脂肪酸酯对 β -胡萝卜素纳米粒子粒径分布的影响

Fig.2 Particle size distribution of β -carotene nanodispersions prepared with the mixture of SC and SE as emulsifiers

从图2可见,添加蔗糖脂肪酸酯可以明显地降低 β -胡萝卜素纳米粒子的粒径,3种添加比例制得的 β -胡萝卜素纳米粒子的粒径都在100 nm以下。当蔗糖脂肪酸酯的添加比例达到2:2时,粒子的粒径就已经与单独使用蔗糖脂肪酸酯制得的 β -胡萝卜素纳米粒子的粒径相似,粒子粒径为35.2 nm。因此,在制备 β -胡萝卜素纳米粒子时,可以以酪蛋白钠部分替换蔗糖脂肪酸酯来作为乳化剂制备小粒径 β -胡萝卜素纳米粒子。所有样品的峰形仍然为双峰类型。

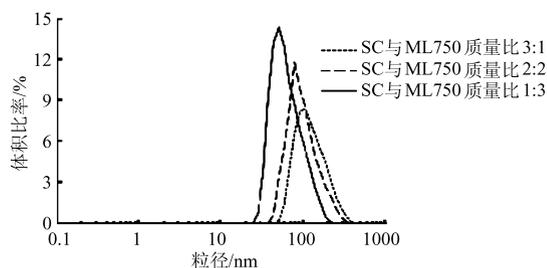


图3 月桂酸十甘油酯的添加对 β -胡萝卜素纳米粒子粒径分布的影响

Fig.3 Particle size distribution of β -carotene nanodispersions prepared with the mixture of SC and ML750 as emulsifiers

表2 添加蔗糖脂肪酸酯对 β -胡萝卜素纳米粒子粒径特性的影响

Tab.2 Characteristics of particle size of β -carotene nanodispersions prepared with the mixture of SC and SE as emulsifiers

SC与SE 质量比	平均粒径 /nm	粒径分布 类型	变异系数 /%
3:1	65.3±3.4	双峰	131.13
2:2	35.2±1.9	双峰	134.41
1:3	37.3±2.3	双峰	132.58

表3 月桂酸十甘油酯的添加对 β -胡萝卜素纳米粒子粒径特性的影响

Tab.3 Characteristics of particle size of β -carotene nanodispersions prepared with the mixture of SC and ML750 as emulsifiers

SC与ML750 质量比	平均粒径 /nm	粒径分布 类型	变异系数 /%
3:1	126.1±2.4	单峰	41.88
2:2	109.9±1.8	单峰	45.08
1:3	78.3±1.4	单峰	65.36

从图3可见,添加月桂酸十甘油酯也可以降低 β -胡萝卜素纳米粒子的粒径,随着月桂酸十甘油酯的添加量增加,制备的 β -胡萝卜素纳米粒子的粒径不断降低,3种添加比例制得的 β -胡萝卜素纳米粒子的粒径为75~130 nm;当月桂酸十甘油酯的添加比例达到2:2时, β -胡萝卜素纳米粒子的粒径为109.9 nm。在实验条件下,以月桂酸十甘油酯和酪蛋白钠的混合物作为乳化剂制备 β -胡萝卜素纳米粒子时,所有样品的粒径均大于单独使用月桂酸甘油酯作为乳化剂,所有样品粒径分布的峰形为单峰类型。

上述结果表明,蔗糖脂肪酸酯与酪蛋白钠混合可以更有效地制备小粒径的 β -胡萝卜素纳米粒子;而从峰形考虑,添加月桂酸十甘油酯可以保持与酪

蛋白钠单独使用制得的粒子的单峰分布。分析认为,当蔗糖脂肪酸酯与酪蛋白钠混合使用制备 β -胡萝卜素纳米粒子时,乳化作用可能主要来源于蔗糖脂肪酸酯,即此时在乳化界面上蔗糖脂肪酸酯具有更强的竞争能力;而当月桂酸十甘油酯与酪蛋白钠混合使用制备 β -胡萝卜素纳米粒子时,两者共同起到乳化作用,两者比例的变化决定了制备的纳米粒子粒径。

2.3 贮藏过程中 β -胡萝卜素纳米粒子的粒径及粒子中 β -胡萝卜素含量的稳定性

贮藏过程中 β -胡萝卜素纳米粒子中 β -胡萝卜素的稳定性测定结果如图4所示。贮藏84 d后粒子的粒径和粒子中 β -胡萝卜素含量如表4所示。

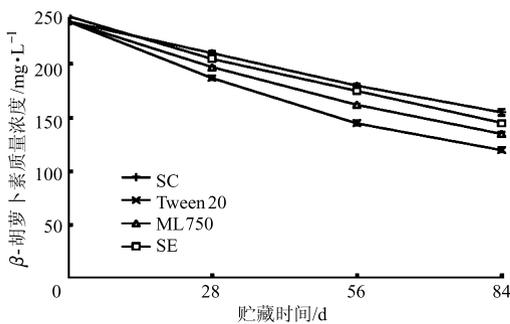


图4 贮藏过程中 β -胡萝卜素纳米粒子中 β -胡萝卜素含量的变化

Fig. 4 Changes in β -carotene content of β -carotene nanodispersions prepared with different emulsifiers during storage

表4 贮藏84 d后 β -胡萝卜素纳米粒子的粒径及粒子中 β -胡萝卜素的保留率

Tab. 4 Particle size of β -carotene nanodispersions and retention of β -carotene after 84 d of storage

乳化剂	平均粒径 /nm	变异系数 /%	β -胡萝卜素 保留率/%
SC	204.9 ± 19.9	35.78	63.3
Tween 20	31.1 ± 1.4	79.63	43.8
ML750	42.0 ± 0.5	88.17	51.9
SE	31.8 ± 2.8	135.42	57.1

由图4和表4可知,贮藏过程中所有 β -胡萝卜素纳米粒子样品中的 β -胡萝卜素含量都有所降低,主要原因在于 β -胡萝卜素自身的不稳定性。对比不同的乳化剂可知,以酪蛋白钠为乳化剂制备的纳米粒子中 β -胡萝卜素稳定性最好,经过84 d的贮藏后仍然有63.3%的 β -胡萝卜素保留;蔗糖脂肪酸酯和月桂酸十甘油酯为乳化剂制备的纳米粒子中 β -胡萝卜素较为稳定, β -胡萝卜素的保留率分别为51.9%和57.1%;而以Tween 20作为乳化剂时 β -胡萝卜素最不稳定,经过84 d的贮藏 β -胡萝卜素的含量降

低了将近56%。

一些研究已经报道了界面上蛋白质具有一定的抗氧化性^[5],这可能是纳米粒子中 β -胡萝卜素保持良好稳定性的原因,并且蛋白质稳定的纳米粒子粒径较大,与外界环境接触面积小也可能是 β -胡萝卜素保持相对稳定的原因之一。另外,蔗糖脂肪酸酯和甘油脂肪酸酯上所具有的官能团也可能为 β -胡萝卜素提供一定的保护作用,相关机理有待于进一步研究。

实验结果也表明,以不同乳化剂制备的纳米溶液均能保持良好的粒径稳定性,在84 d的贮藏过程中所有样品的粒径均没有发生明显的变化。

2.4 TEM分析结果

典型的 β -胡萝卜素纳米粒子透射电镜分析影像如图5所示(SC与SE质量比为1:1)。形态学观察显示 β -胡萝卜素纳米粒子是具有很好边界的球形粒子,粒径范围大多处于25~50 nm的范围内。此分析结果与粒径测定仪器结果基本吻合。

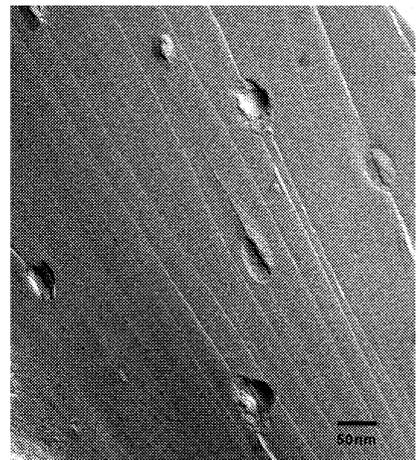


图5 β -胡萝卜素纳米粒子代表性的电镜影像
Fig. 5 TEM images of β -carotene nanodispersions prepared with the combination of sodium caseinate and sugar ester

3 结束语

乳化剂的类型对 β -胡萝卜素纳米粒子的制备有明显的影晌,采用相同质量比的蔗糖脂肪酸酯与酪蛋白钠作为乳化剂可以制备粒径小于50 nm的 β -胡萝卜素纳米粒子;以酪蛋白钠、蔗糖脂肪酸酯和月桂酸十甘油酯作为乳化剂制备的粒子中 β -胡萝卜素的稳定性也明显好于Tween 20,这些结果表明在 β -胡萝卜素纳米粒子的制备中,可以以酪蛋白钠部分替换蔗糖脂肪酸酯,用来制备粒径小、稳定性好的 β -胡萝卜素纳米粒子。
(下转第111页)

参 考 文 献

- 1 Onay O, Kockar O M. Slow, fast, and flash pyrolysis of rapeseed[J]. *Renewable Energy*, 2003, 28(15): 2417~2433.
- 2 Aclkgoz C, Onay O, Kockar O M. Fast pyrolysis of linseed: product yields and compositions[J]. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 2004, 71(2): 417~429.
- 3 Tsai W T, Lee M K, Chang Y M. Fast pyrolysis of rice straw, sugarcane bagasse and coconut shell in an induction-heating reactor[J]. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 2006, 76(1~2): 230~237.
- 4 陆强, 朱锡锋, 李全新, 等. 生物质快速热解制备液体燃料[J]. *化学进展*, 2007, 19(7~8): 1 064~1 071.
Lu Qiang, Zhu Xifeng, Li Quanxin, et al. Biomass fast pyrolysis for liquid fuels[J]. *Progress in Chemistry*, 2007, 19(7~8): 1 064~1 071. (in Chinese)
- 5 董芑, 齐国利, 王丽, 等. 生物质快速热解制取生物质油[J]. *太阳能学报*, 2007, 28(2): 223~226.
Dong Peng, Qi Guoli, Wang Li, et al. Experiment study on producing biomass pyrolysis oil by biomass flash pyrolysis[J]. *Acta Energetica Solaris Sinica*, 2007, 28(2): 223~226. (in Chinese)
- 6 陈祎, 罗永浩, 陆方, 等. 生物质废弃物的热解研究[J]. *燃料化学学报*, 2007, 35(3): 370~374.
Chen Yi, Luo Yonghao, Lu Fang, et al. TG study on characteristics of pyrolysis of biomass waste[J]. *Journal of Fuel Chemistry and Technology*, 2007, 35(3): 370~374. (in Chinese)
- 7 杨素文, 丘克强. 生物质真空热解液化技术研究现状[J]. *现代化工*, 2008, 28(1): 22~26.
Yang Suwen, Qiu Keqiang. Present research of vacuum pyrolytic liquefaction technology for biomass[J]. *Modern Chemical Industry*, 2008, 28(1): 22~26. (in Chinese)
- 8 张健, 李文志, 陆强, 等. 复配乳化剂乳化生物油/柴油技术[J]. *农业机械学报*, 2009, 40(2): 103~106, 102.
Zhang Jian, Li Wenzhi, Lu Qiang, et al. Emulsification technology of bio-oil in diesel with combined surfactants[J]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2009, 40(2): 103~106, 102. (in Chinese)
- 9 Russell J A, Miller R K, Molton P M. Formation of aromatic compounds from condensation reactions of cellulose degradation products[J]. *Biomass*, 1983, 3(1): 43~57.
- 10 Alen R, Kuoppala E, Oesch P. Formation of the main degradation compound groups from wood and its components during pyrolysis[J]. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 1996, 36(2): 137~148.

(上接第 115 页)

参 考 文 献

- 1 Mosqueira V C F, Legrand P, Pinto-Alphandary H, et al. Poly (D, L-lactide) nanocapsules prepared by a solvent displacement process: influence of the composition on physicochemical and structural properties[J]. *J. Pharm. Sci.*, 2000, 89(5): 612~625.
- 2 Che Man Y B, Tan C P. Carotenoids, in lipid for functional foods and nutraceuticals[M]. Ed. by Gunstone F D. Bridgewater: Oily Press, 2003: 25~52.
- 3 Moraru C I, Panchapakesan C P, Huang Q, et al. Nanotechnology: a new frontier in food science[J]. *Food Technology*, 2003, 57(12): 24~29.
- 4 Couvreur P, Barratt G, Fattal E, et al. Nanocapsule technology: a review [J]. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 2002, 19(2): 99~134.
- 5 Quintanar-Guerrero D, Allemann E, Fessi H, et al. Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers [J]. *Drug Development and Industry Pharmacy*, 1998, 24(12): 1 113~1 128.
- 6 Iwase H. Simultaneous sample preparation for high-performance liquid chromatographic determination of vitamin A and β -carotene in emulsified nutritional supplements after solid-phase extraction[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2002, 463(2): 21~29.
- 7 Ribeiro H S, Ax K, Schubert H. Stability of lycopene emulsions in food systems[J]. *Journal of Food Science*, 2003, 68(2): 2 730~2 734.