

# 深海鱼油纳米乳制备方法研究

季方圆,何艳琳,隋 箐,徐开俊,曹仁俭

(中国药科大学理学院,南京 211198)

**摘要:**研究了深海鱼油纳米乳的制备方法,并对制备的纳米乳的理化性质进行了分析。以深海鱼油为油相,采用表面活性剂复配法从 Span-20、Span-80、Tween-20、Tween-80 中筛选合适的乳化剂。结果表明:以 Span-80 和 Tween-80 体积比为 19:81 的混合液作为乳化剂,以无水乙醇为助表面活性剂;当  $V(\text{混合表面活性剂}):V(\text{深海鱼油}):V(\text{蒸馏水})=8:2:20$  时,所制备纳米乳为 O/W 型,其表观澄清透明,粒径范围在 7~25 nm 之间,多分散系数(PDI)范围在 0.15~0.25 之间。用三相图表示纳米乳的成乳范围。稳定性试验表明所制备的纳米乳离心后能保持稳定,但对高温不耐受,需 25℃ 以下保存。

**关键词:**深海鱼油;纳米乳;表面活性剂;三相图;粒径

中图分类号:TS225;TS201

文献标识码:A

文章编号:1003-7969(2018)03-0075-04

## Preparation of deep sea fish oil nanoemulsion

JI Fangyuan, HE Yanlin, SUI Qing, XU Kaijun, CAO Renjian

(College of Science, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China)

**Abstract:** The preparation method of deep sea fish oil nanoemulsion was investigated, and the physico-chemical properties of the prepared nanoemulsion were measured. The deep sea fish oil was used as oil phase, and the proper emulsifier was screened from Span-20, Span-80, Tween-20 and Tween-80 by surfactant combination method. The results showed that with mixture of Span-80 and Tween-80 with volume ratio 19:81 as emulsifier and anhydrous ethanol as cosurfactant, when the volume ratio of mixed surfactant to deep sea fish oil and distilled water was 8:2:20, the prepared nanoemulsion was O/W type, apparent clear and transparent, the particle size ranged from 7 nm to 25 nm, and the polydispersity index (PDI) ranged from 0.15 to 0.25. The milk emulsion range of nanoemulsion was indicated by three phase diagram. The stability test results showed that the prepared nanoemulsion could keep stable after being centrifuged and unstable at high temperature, so it needed to be stored below 25℃.

**Key words:** deep sea fish oil; nanoemulsion; surfactant; three phase diagram; particle size

深海鱼油因富含  $\omega-3$  类不饱和脂肪酸而具有营养保健和临床药用价值,其中不饱和脂肪酸二十碳五烯酸(EPA)、二十二碳六烯酸(DHA)具有很好的生理活性<sup>[1-2]</sup>,EPA、DHA 对心血管疾病的防治、婴幼儿的生长发育、以及抗炎方面都有积极的作用,被认为是很有潜力的功能食品、营养保健品和天然

药物,在饲料添加剂、食品和医药保健品领域发挥作用。然而市面上的鱼油产品主要有以下缺点:①深海鱼油主要以胶囊形式销售,味道略腥,口服顺应性差;②因为深海鱼油难溶于水,难以使用水溶性添加剂来改善鱼油气味和口感,生物利用度低,产品形式和成分单一。因此,改善鱼油产品的气味性状和溶解度能更好地发挥深海鱼油中主要营养成分的作用。

纳米乳是由水相、油相、表面活性剂和助表面活性剂按适当比例形成粒径为 10~100 nm,具有低黏度、各向同性的热力学和动力学稳定的透明或半透明体系<sup>[3]</sup>。作为新型活性物质载体,纳米乳具有以下优点:热力学稳定,高热高压灭菌和离心均不会分层;制备过程简单,可通过超声、搅拌等方法制备;能

收稿日期:2017-10-12;修回日期:2017-12-21

基金项目:江苏省研究生科研创新计划(KYZZ16\_0421)

作者简介:季方圆(1992),女,硕士研究生,研究方向为油脂的提纯及酯交换反应(E-mail)jfyepu@163.com。

通信作者:徐开俊,教授,硕士生导师(E-mail)xukaijun@126.com。

够提高油性物质溶解度从而提高生物利用度。在材料、化工、食品、药品等领域已被广泛使用<sup>[4-6]</sup>。因此,考虑将深海鱼油制备成纳米乳,不仅可以提高深海鱼油的水溶性从而添加能够改善其腥味的水溶性物质,也可以将深海鱼油包裹其中,防止鱼油中主要营养成分 EPA 和 DHA 过早地被氧化生成对人体有害的物质<sup>[7-8]</sup>。

目前已有文献通过搅拌法、超声乳化法制备胡椒精油<sup>[3]</sup>、紫苏子油<sup>[9]</sup>、冬青油<sup>[10]</sup>纳米乳,然而关于鱼油制备成纳米乳的文献并不多<sup>[11-12]</sup>。本文通过搅拌法制备深海鱼油纳米乳,探索了制备深海鱼油纳米乳的不同成分配比,并用三相图直观表示成乳范围,对其理化性质和稳定性进行了评价,克服了深海鱼油在水中不溶、生物利用度低、口服顺从性差等缺点,旨在更好地发挥鱼油中有效成分的作用,同时结合三相图法为乳化剂复配法制备纳米乳提供一定的理论参考价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

#### 1.1.1 原料与试剂

深海鱼油(经分子蒸馏,EPA + DHA > 30%),西安明朗生物科技有限公司;Span - 20、Span - 80、Tween - 20、Tween - 80,均为分析纯;无水乙醇、1,2 - 丙二醇、丙三醇、乙二醇、异丁醇、亚甲基蓝、苏丹红 III,均为分析纯。

#### 1.1.2 仪器与设备

Nano ZS90 马尔文粒度仪(英国马尔文仪器有限公司),FSH - 2A 可调高速匀浆机(金坛市城东新瑞仪器厂),ZNHW - 4 型智能恒温控温仪(常州国华电器有限公司),80 - 2 离心沉淀器(江苏新康医疗器械有限公司),HYQ - 2121A 涡旋混匀器(苏州捷美电子有限公司),SNB - 1 黏度计(上海方瑞仪器有限公司)。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 单一表面活性剂的筛选

取 20 mL 试管 4 支(编号为 1 号、2 号、3 号、4 号),每支试管中分别加入 3 mL 深海鱼油后,1 号试管中加入 0.5 mL Span - 20,2 号试管中加入 0.5 mL Span - 80,3 号试管中加入 0.5 mL Tween - 20,4 号试管中加入 0.5 mL Tween - 80,涡旋振荡 10 s,使之充分混匀。4 支试管中均加入蒸馏水至总体积 10 mL 刻度处,涡旋振荡 3 min,使之充分混匀。静置计时,分别记录静置不同时间试管中乳液的分层体积。

#### 1.2.2 复合表面活性剂的筛选

将两种乳化效果较好的表面活性剂分别按照不

同比例混合。取 3 mL 深海鱼油加入 20 mL 试管中,分别加入不同配比的复合表面活性剂共 0.5 mL,涡旋振荡 10 s,使之充分混匀。接着加入蒸馏水至总体积 10 mL 刻度线,涡旋振荡 3 min,使之充分混匀。静置计时,分别记录静置不同时间试管中乳液的分层体积。

#### 1.2.3 助表面活性剂的选择

在乳液中加入助表面活性剂可以改变表面活性剂的表面活性及亲水亲油平衡值(HLB 值),调整水或油的极性,有助于乳液的形成。本试验从无水乙醇、1,2 - 丙二醇、丙三醇、乙二醇、异丁醇中挑选合适的助表面活性剂。将 1.2.2 选出的表面活性剂分别与上述试剂以质量比 3:1 混合均匀后,置于离心管中,以 1 500 r/min 的速度离心 15 min,取出观察是否分层。

#### 1.2.4 纳米乳的制备<sup>[13]</sup>以及三相图的绘制<sup>[14]</sup>

将筛选出的复合表面活性剂与助表面活性剂按质量比 3:1 混合,并与深海鱼油以质量比 9:1、8:2、7:3、6:4、5:5、4:6、3:7、2:8、1:9 的比例混合,室温条件下置于匀浆机中,以 15 000 r/min 的转速搅拌 1 min 后逐滴滴加蒸馏水。观察搅拌过程中乳液黏度先变大后变小,以及乳液从澄清到浑浊再到澄清的现象,记录下临界点水的滴加量,通过粒度仪判断制备的乳剂是否合格,找到纳米乳合适的油水配比并将纳米乳范围用三相图表示出来。三相图能够直观表示形成纳米乳的各成分配比及成乳区域<sup>[15]</sup>。在三相图中,分别以水、深海鱼油以及混合表面活性剂为顶点,用化学制图软件 Origin 绘制纳米乳区域。

#### 1.2.5 纳米乳理化性质分析

通过澄清度、丁达尔现象初步判断是否形成纳米乳。测定纳米乳折光率、黏度比较纳米乳形成前后物理性质的变化。测定纳米乳表面张力,判断纳米乳形成前后其表面张力是否明显降低。通过比较亚甲基蓝、苏丹红 III 在纳米乳中的扩散速度确定形成的纳米乳是 O/W 型还是 W/O 型<sup>[16]</sup>。通过马尔文粒度仪测定纳米乳中分散相的粒径并通过多分散系数(PDI)评价所制备纳米乳的分散性。

#### 1.2.6 稳定性检测<sup>[17]</sup>

##### 1.2.6.1 离心试验

取 3 批纳米乳放入离心管中,在 5 000 r/min 的转速下离心 15 min,观察离心后纳米乳外观并检测粒度、PDI 的变化。

##### 1.2.6.2 温度试验

取 3 批纳米乳分别在 4、25、50 °C 放置,观察 15 d 后的外观并检测粒度、PDI 的变化。

## 2 结果与讨论

### 2.1 表面活性剂的筛选

单一表面活性剂的乳化效果如表1所示。由表1可见,Span-20和Tween-20作表面活性剂时,乳液稳定性差,在短时间内分层,而用Span-80和Tween-80作表面活性剂时,乳液稳定性好,所以选用Span-80和Tween-80进行表面活性剂的复配。根据HLB值的计算公式计算混合表面活性剂的HLB值,选用不同HLB值的复合表面活性剂的乳液分层体积如表2所示。由表2可见,当复合表面活

性剂Span-80和Tween-80的HLB值为13时,乳液稳定性最好,能保持长时间不分层,此时Span-80和Tween-80的体积比为19:81。

表1 单一表面活性剂乳化效果

乳化剂	HLB值	分层体积/mL				
		5 min	15 min	30 min	60 min	120 min
Span-80	4.3	0	0	0	0.9	1.2
Span-20	8.6	4.0	4.2	4.8	5.0	5.6
Tween-80	15.0	0	0	0	0.2	0.5
Tween-20	16.7	2.0	4.2	5.0	5.2	6.0

表2 复合表面活性剂乳化效果

复合表面活性剂 HLB值	添加 Span-80 体积/mL	添加 Tween-80 体积/mL	分层体积/mL				
			5 min	15 min	30 min	60 min	120 min
5	0.465	0.035	1.8	2.2	2.6	2.6	2.8
7	0.375	0.125	0	0	0	3.0	6.6
9	0.280	0.220	0	0	0	5.4	5.8
11	0.185	0.315	0	0	0	1.0	1.7
13	0.095	0.405	0	0	0	0	0

### 2.2 助表面活性剂的筛选

根据2.1中复合表面活性剂的筛选结果,选择Span-80和Tween-80体积比为19:81时的混合液作为复合表面活性剂,助表面活性剂筛选结果如表3所示。由表3可见,无水乙醇与异丁醇均能作为深海鱼油纳米乳的助表面活性剂,本试验中选择无水乙醇作为助表面活性剂。

表3 助表面活性剂筛选结果

助表面活性剂	无水乙醇	1,2-丙二醇	丙三醇	乙二醇	异丁醇
是否分层	不分层	分层	分层	分层	不分层

### 2.3 三相图的绘制

按照1.2.4方法在试验过程中发现,混合表面活性剂与深海鱼油质量比9:1、8:2、7:3时能形成纳米乳,将试验数据点连接起来,绘制深海鱼油纳米乳三相图,结果见图1。

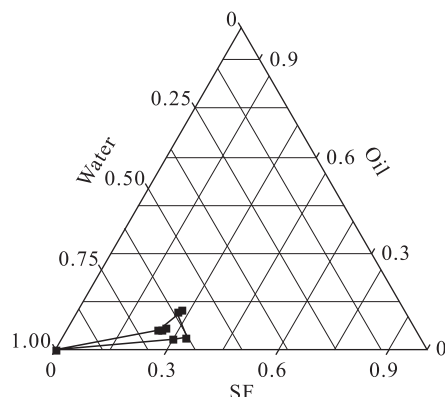


图1 深海鱼油纳米乳三相图

图1中Oil代表油相、Water代表水相、SF代表混合表面活性剂,曲线围起来的范围即是能形成纳米乳的区域。当 $V(\text{混合表面活性剂}):V(\text{深海鱼油}):V(\text{蒸馏水})=8:2:20$ 时,形成的纳米乳粒径大小合适且最为稳定,在下述理化性质测定及稳定性试验中均选择此比例进行试验。

### 2.4 深海鱼油纳米乳理化性质分析

制备的深海鱼油纳米乳澄清,略带乳黄色,有丁达尔现象。深海鱼油纳米乳的黏度 $61.8 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ 、折光率 $1.368$ 、表面张力 $44.47 \times 10^{-3} \text{ N/m}$ ,形成的深海鱼油纳米乳很大程度地降低了水的表面张力。在扩散试验中,亚甲基蓝在深海鱼油纳米乳中的扩散速度快于苏丹红Ⅲ,确定所制备的深海鱼油纳米乳为O/W型。所制备的纳米乳粒径范围在 $7 \sim 25 \text{ nm}$ , $PDI$ 范围在 $0.15 \sim 0.25$ 之间,符合纳米乳标准。

### 2.5 稳定性试验

#### 2.5.1 离心试验

3批纳米乳在 $5000 \text{ r/min}$ 的转速下离心 $15 \text{ min}$ 后仍然澄清,未产生分层、破乳现象,平均粒径变化在 $1 \text{ nm}$ 以内且 $PDI$ 符合检测标准,可判断深海鱼油纳米乳离心后仍能保持稳定。

#### 2.5.2 温度试验

3批纳米乳分别在 $4$ 、 $25$ 、 $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 下放置, $15 \text{ d}$ 后纳米乳表观以及粒径变化如表4所示。由表4可见,深海鱼油纳米乳在 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 以下能长期保存,理化性质未发生变化,但高温会对纳米乳造成破坏,使之

粒径变大而聚沉,将纳米乳在 50℃ 放置 15 d 后,粒径增大了 10 倍,颜色变深,全波长扫描纳米乳在 4、50℃ 静置 15 d 后紫外波长吸收情况,结果如 2 所示。

表 4 温度稳定性试验结果

温度/℃	时间/d	折光率	粒径/nm	PDI
4	0	1.365	8.083	0.275
	15	1.366	8.751	0.234
25	0	1.368	9.368	0.271
	15	1.369	23.260	0.294
50	0	1.366	7.864	0.197
	15	1.392	108.000	0.491

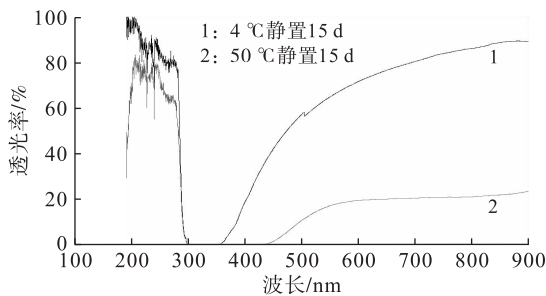


图 2 纳米乳在不同温度下静置后紫外全波长扫描图

由图 2 可见,纳米乳在 190~900 nm 的波段进行紫外扫描,50℃ 下静置 15 d 的纳米乳在 190~900 nm 区间透光率均小于 4℃ 下静置 15 d 的纳米乳。50℃ 下静置 15 d 后的纳米乳粒径变大,猜测可能是高温造成纳米乳结构的破坏,不饱和脂肪酸内部双键被氧化,使被包裹其中的油相结构破坏、粒径变大而聚沉。随着纳米乳结构被破坏,其粒径增大,折光率变大,吸光度和吸收波长范围均增大,颜色变深。

### 3 结论

本试验系统地探索了深海鱼油纳米乳的制备方法。通过搅拌法制备深海鱼油纳米乳,探索了制备深海鱼油纳米乳的不同分配比、并用三相图直观表示成乳范围。最终筛选结果为选用 Span-80 和 Tween-80 体积比为 19:81,HLB 值为 13 的复合表面活性剂,无水乙醇为助表面活性剂,用三相图作出了纳米乳成乳范围并通过理化性质的检测确定最佳成乳比例为  $V(\text{混合表面活性剂}):V(\text{深海鱼油}):V(\text{蒸馏水})=8:2:20$ ,制备出的深海鱼油纳米乳外观透明,流动性好,是 O/W 型纳米乳,粒径以及分散性符合纳米乳要求,离心后仍能保持均一稳定,但不耐高温,需要 25℃ 以下保存。

对于深海鱼油来说,制备出合格的纳米乳能够更好发挥鱼油中有效成分的作用,为深海鱼油制品的剂型设计提供了新的思路,在纳米乳中增加合适的添加剂提高鱼油中有效成分的价值或制备成载药

体系可望成为新的研究方向。

### 参考文献:

- [1] 夏金梅,许晨,许建中. 鱼油乙酯的反相液相色谱-质谱检测研究[J]. 化学工程与装备,2015(1):182-187.
- [2] 王海磊,罗庆华,黄美娥. 鱼油的提取方法及精制工艺探讨[J]. 湖南农业科学,2012(17):99-102.
- [3] 何君,姚晓玲,冯桂仁,等. 胡柚精油纳米乳的制备及品质评价[J]. 食品研究与开发,2015,36(1):3-6.
- [4] YANG S P, LIU H L, WANG C G, et al. Effect of oxidized fish oil on growth performance and oxidative stress of *Litopenaeus vannamei*[J]. Aquacult Nutr, 2015, 21(1):121-127.
- [5] BAINUN I N, HASHIMAH A N, SYED - HASSAN S S A. Nanoemulsion: formation, characterization, properties and applications—a review [J]. Adv Mater Res, 2015, 1113: 147-152.
- [6] AHMED K, LI Y, MCCLEMENTS D J, et al. Nanoemulsion - and emulsion - based delivery systems for curcumin: encapsulation and release properties [J]. Food Chem, 2012, 132(2): 799-807.
- [7] 朱丽娜,张志国,张敏,等. DHA 的生理功能及其在食品中的稳定性[J]. 中国乳品工业,2009,37(2):45-48.
- [8] 翁新楚,董新伟. EPA 和 DHA 的生理功能及其氧化稳定性[J]. 中国生物工程杂志,1994,14(6):56-60.
- [9] 吴旭锦,欧阳五庆,朱小甫,等. 紫苏子油纳米乳的研制[J]. 中草药,2007,38(11):1629-1632.
- [10] 王文革,李志芳,杨建宏,等. 不同乳化剂系统制备冬青油纳米乳的比较研究[J]. 时珍国医国药,2011,22(2):481-482.
- [11] 郑景霞,白春清,陆天洋,等. 鱼油纳米乳的制备及贮藏稳定性研究[J]. 中国油脂,2017,42(4):47-52.
- [12] 刘维维,吴鹏,王昭凯,等. 真空冷冻干燥微藻 DHA 油纳米乳工艺研究[J]. 时珍国医国药,2017,41(4):51-55.
- [13] 唐仕,李嘉诚,牛迪,等. 复配非离子生物柴油纳米乳的制备工艺[J]. 化工科技,2011,19(3):16-20.
- [14] 凌春生,吴强,张丹. 氟苯尼考自微乳制剂的研制[J]. 中国抗生素杂志,2009,34(8):493-497.
- [15] LAWRENCE M J, REES G D. Microemulsion - based media as novel drug delivery systems [J]. Adv Drug Deliver Rev, 2000, 45(1):89-121.
- [16] 周莹,欧阳五庆,郭建军,等. 复方联苯苄唑纳米乳的制备及其质量评价[J]. 食品研究与开发,2012,29(8):790-794.
- [17] 孙志高,黄巧娟,盛冉,等.  $\beta$ -隐黄素纳米乳的制备及其稳定性研究[J]. 食品与发酵工业,2017,43(3):175-179.