

医药与日化原料

改性柑橘果胶-乳清蛋白稳定的精油 Pickering 乳液

周中玉, 胡飞*

(华南理工大学 食品科学与工程学院, 广东 广州 510640)

摘要: 以改性柑橘果胶和乳清蛋白为乳化剂, 对月桂精油、百里香精油、牛至精油及佛手柑精油进行包埋, 通过高压均质法制备了改性柑橘果胶-乳清蛋白复合纳米粒稳定的 4 种精油 Pickering 乳液。采用纳米粒度及 Zeta 电位分析仪、SEM、FTIR 和流变仪对乳液进行了表征, 并通过药敏实验评价了乳液的抑菌效果。结果表明, 经过辐照处理后的改性柑橘果胶的乳化能力显著增强, 乳化性提高至 $(548.114\pm 18.737) \text{ m}^2/\text{g}$ 。FTIR 结果证明了聚合物的形成和精油的成功包封。乳液粒径在 829~1147 nm 之间, 耐受离心且贮存 77 d 后的稳定性均>91%。流变学测试表明, 4 种乳液均属于假塑性流体。乳液对不同精油的包封率在 5.82%~21.54%之间, 载药率在 0.86%~5.25%之间, 且对包埋的精油具有控释效果。4 种乳液对两种食品微生物(大肠杆菌和金黄色葡萄球菌)均具有显著抑制作用, 抑菌圈直径为 7.51~34.97 mm。

关键词: 改性柑橘果胶; 精油; Pickering 乳液; 乳清蛋白; 包埋递送; 医药与日化原料

中图分类号: TS201.7 文献标识码: A 文章编号: 1003-5214(2023)05-1090-10

Essential oil Pickering emulsions stabilized by modified citrus pectin-whey proteins

ZHOU Zhongyu, HU Fei*

(School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, Guangdong, China)

Abstract: Four essential oil Pickering emulsions were prepared by high-pressure homogenization method using modified citrus pectin and whey protein as emulsifier to embed essential oils of laurel, thyme, oregano and bergamot. The emulsions obtained were then characterized by particle size and Zeta potential analyzer, SEM, FTIR and rheometer, and evaluated for bacteriostatic performance by drug sensitivity tests. The results showed that the emulsification capacity of citrus pectin modified by irradiation was significantly increased to $(548.114\pm 18.737) \text{ m}^2/\text{g}$. Data from FTIR analysis indicated that the polymers were successfully synthesized and the essential oils were successfully encapsulated. The emulsions obtained displayed a particle size distribution of 829~1147 nm, and retained >91% stability after being centrifuged and stored for 77 d. The results from rheological test revealed that the four emulsions were pseudoplastic fluids. Meanwhile, the emulsions exhibited encapsulation efficiency for different essential oil of 5.82%~21.54% and drug-loading rate between 0.86% and 5.25%, with controlled release effect on the embedded essential oils. In addition, the four emulsions showed significant growth inhibition effects on two food microorganisms (*E. coli* and *S. aureus*) with the inhibition circle diameter from 7.51 to 34.97 mm.

Key words: modified citrus pectin; essential oils; Pickering emulsions; whey protein; embedded delivery; drug and cosmetic materials

精油是从芳香植物和草本植物中发现的天然化合物, 具有出色的抗菌和抗氧化能力^[1]。近年来, 精油被广泛应用于食品、制药、纺织和化妆品等行业^[2]。然而, 精油在光照和氧气中加热时容易蒸发

或分解, 限制了其开发和应用^[3]。为了降低应用过程中精油的损失, 国内外学者寻求了多种方法提高精油的稳定性, 包括脂质化技术^[4]、微胶囊法^[5]、乳化法^[6]等。其中, 乳化法因操作简便而被广泛应用。

收稿日期: 2022-05-30; 定用日期: 2022-09-30; DOI: 10.13550/j.jxhg.20220512

基金项目: 广东省自然科学基金(2021A1515010732)

作者简介: 周中玉(1998—), 女, 硕士生, E-mail: yuminyya@163.com。联系人: 胡飞(1972—), 男, 副教授, E-mail: g95216@163.com。

Pickering 乳液是由固体颗粒稳定乳液体系的新型乳液, 可以对生物活性物质起到保护、递送、控释等作用^[7]。生物相容性和安全性较好的蛋白基颗粒、多糖基颗粒被广泛地用于稳定 Pickering 乳液^[8]。相关研究实现了不同食品胶体颗粒(如玉米醇溶蛋白^[9]、改性纤维素纳米晶体^[10]、玉米淀粉^[11])稳定的 Pickering 乳液对精油的包封。但使用乳清蛋白(WPI)或柑橘果胶(CP)或 WPI-CP 复合颗粒作为 Pickering 乳液稳定剂来包裹精油的研究较少。WPI 和 CP 是可食用的天然材料, 具有一定的乳化性, 可直接用于稳定 Pickering 乳液。但 CP 乳化能力较低, 通过辐照处理能有效地降解果胶, 从而提高其乳化性能^[12]。WPI 的乳化性较好但缺乏表面电荷的排斥作用, 容易发生聚集而使乳状液破裂, 与带电物质结合可以提高其稳定性^[13]。为了进一步提高乳液性能, 本文考察了对 CP 进行辐照改性后, 与 WPI 复合作为稳定剂制备负载精油的 Pickering 乳液的可行性。

本文以改性 CP 和 WPI 复合颗粒作为稳定剂, 构建了负载月桂精油(LEO)、百里香精油(TEO)、牛至精油(OEO)、佛手柑精油(BEO)的 Pickering 乳液, 分别命名为 LPEO、TPEO、OPEO、BPEO。对乳液的形成机理、微观结构及物化性质进行了研究, 并探索了 4 种乳液对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑制效果, 这对丰富乳化体系的构建具有理论意义, 以期乳液体系内物质输送提供一种可行的实验方法。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

CP(酯化度 66%~69%, 食品级)、WPI(质量分数 80%, AR), 北京索莱宝生物科技有限公司; LEO、TEO、OEO、BEO, 食品级, 江西万花香料有限公司; 金黄色葡萄球菌、大肠杆菌, 中国微生物菌种保藏中心; 无水乙醇、氢氧化钠、乙酸钠、乙酸、

H₂O₂(质量分数 30%)、十二烷基硫酸钠(SDS)、氯化钠、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、氯化钾, AR, 国药集团化学试剂有限公司。

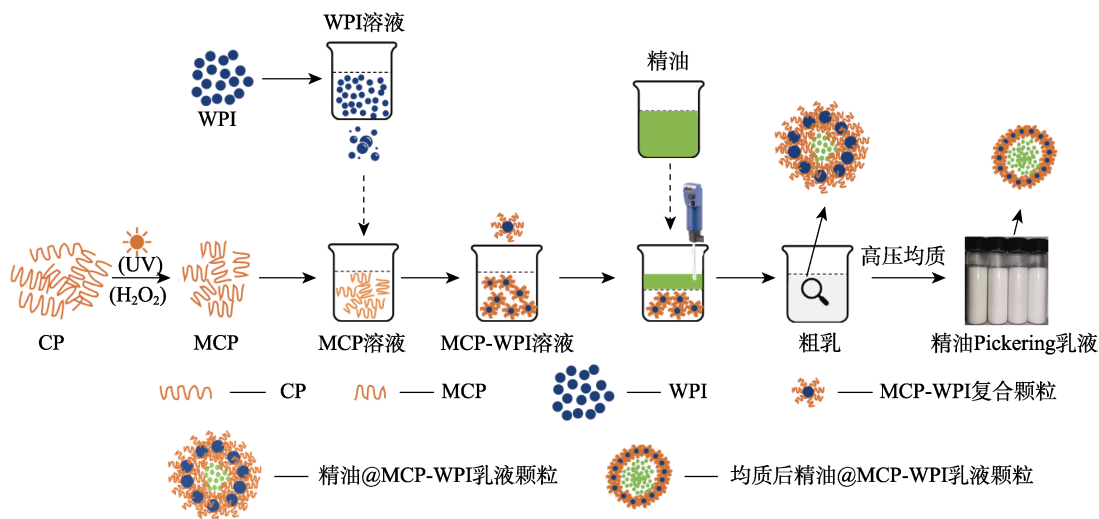
CEL-LAB500 紫外光化学反应仪, 北京中教金源科技有限公司; FJ200-SH 型数显高速分散均质机, 上海标本模型厂; APV-1000 型高压均质机, 丹麦 APV 公司; FDU-2110 冷冻干燥机, 杭州嘉维创新科技有限公司; Nicolet iS50-Nicolet Continuum 型傅里叶变换红外光谱仪、Haake MARS III 流变仪, 美国 Thermo Scientific 公司; EVO18 扫描电子显微镜, 德国蔡司公司; OLYMPUS BX51 显微镜, 上海富莱光学科技有限公司; Malvern Zetasizer 纳米粒度及 Zeta 电位分析仪, 英国 Malvern 仪器有限公司; Cary 60 型紫外-可见分光光度计, 美国 Agilent 公司; SW-CJ-1FD 超净工作台, 上海博讯医疗生物仪器股份有限公司。

1.2 乳液的制备

称取适量 CP 溶于 pH 4 的 0.01 mol/L 乙酸钠-乙酸缓冲溶液, 获得质量分数为 4% 的 CP 溶液。向 CP 溶液中加入 H₂O₂(CP 溶液中每含 1 g CP 加入 0.3 mL H₂O₂)后置于紫外光(150 W)下磁力搅拌, 照射 3 h 后得到改性柑橘果胶溶液(MCP 溶液)。取部分 MCP 溶液于-80 °C 冷冻干燥 3 d 后得到 MCP 固体样品。称取适量 WPI 溶于蒸馏水获得质量分数为 4% 的 WPI 溶液。

以 V(MCP 溶液): V(WPI 溶液)=1:1 配制 MCP-WPI 溶液, 持续搅拌充分混合后将 TEO、LEO、OEO、BEO 分别以 V(精油): V(MCP-WPI 溶液)=1:2 加至 MCP-WPI 溶液中, 经高速(12000 r/min)剪切 2 min 后, 利用高压均质机 50 MPa 高压均质 3 次获得 TPEO、LPEO、OPEO、BPEO。于-80 °C 冷冻干燥 3 d 后得到固体样品。

Pickering 乳液的形成示意图如下所示。



1.3 结构表征及性能测试

1.3.1 CP 的乳化能力及乳化稳定性

配制 1 g/L 的 CP 水溶液和质量分数为 0.1% 的 SDS 水溶液, 取 15 mL CP 溶液与 5 mL 大豆油混合, 经高速 (10000 r/min) 剪切 2 min 后得到乳浊液, 立即取 40 μ L 乳浊液加入到 10 mL SDS 溶液中, 充分混合均匀, 在 500 nm 处测定其吸光度 (A_0)。乳浊液静置 30 min 后取 40 μ L 加入到 10 mL SDS 溶液中, 在 500 nm 处测定其吸光度 (A_{30})。按式 (1) 计算乳化性 (EAI), 按式 (2) 计算乳化稳定性 (ESI)。未改性柑橘果胶为参照。

$$\text{EAI}/(\text{m}^2/\text{g}) = \frac{2 \times 2.303 \times A_0 \times N}{w \times \varphi \times 10000} \quad (1)$$

$$\text{ESI}/\text{min} = \frac{A_0}{A_0 - A_{30}} \times 30 \quad (2)$$

式中: N 为稀释倍数, 取值 250; w 为 SDS 质量分数; φ 为油相体积分数, 为 25%。

1.3.2 乳液颗粒大小、多分散性指数 (PDI) 和 Zeta 电位的测定及形态观察

使用纳米粒度及 Zeta 电位分析仪检测乳液的粒径大小和分布情况, 每个样品重复测定 3 次, 取平均值。

使用显微镜观察乳液的微观形态, 取适量乳液滴于载玻片上, 置于 50 倍物镜下观察乳液的微观结构。

通过扫描电子显微镜测定乳液颗粒的形态。取适量乳液稀释 50 倍后滴于锡箔纸上, 镀金后观察形态。

1.3.3 傅里叶变换红外光谱分析

取适量样品与 KBr 混合, 以空白 KBr 来调整基线水平并对差异化光谱进行归一化处理, 测定波数为 4000~500 cm^{-1} , 扫描次数设置为 32 次, 采用 Omnic 软件在去噪和基线校正后获得 CP、MCP、WPI、4 种精油及 4 种精油乳液的 FTIR 光谱。

1.3.4 流变学分析

使用流变仪测试乳液的流变性能。

稳态扫描模式: 温度 25 $^{\circ}\text{C}$, 传感器型号 C60/1 Ti L, 测量间隙 0.052 mm, 测试前平衡 2 min, 剪切速率 0.1~100 s^{-1} 。

剪切应变扫描: 以频率 1 Hz 对乳液进行应变扫描, 应变范围为 0.1%~1000%。用线性黏弹性区评价结构的破坏情况。

振荡频率模式: 温度为 25 $^{\circ}\text{C}$, 在线性黏弹区内选取应力 60%, 频率 0.1~10 Hz。

1.3.5 乳液的稳定性

将样品置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下贮存, 采用 1.3.2 节方法测定乳液的粒径及 PDI 变化。

采用离心和贮存方法测试精油乳液的整体稳定性。室温下, 准确量取 10 mL 乳液于 15 mL 离心管中, 在 5000 r/min 下分别离心 15 和 60 min。分别记录离心前乳液的初始高度 (H_0 , cm)、离心 15 min 后乳化层的高度 (H_{15} , cm) 和离心 60 min 后乳化层的高度 (H_{60} , cm), 由公式 (3) 和 (4) 分别计算乳液离心 15 min 的稳定性 (ES_{15} , %) 和乳液离心 60 min 的稳定性 (ES_{60} , %)

$$\text{ES}_{15}/\% = \frac{H_{15}}{H_0} \times 100 \quad (3)$$

$$\text{ES}_{60}/\% = \frac{H_{60}}{H_0} \times 100 \quad (4)$$

将乳液置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下静置保存 77 d, 测定保存不同天数后的乳液上层乳化层的高度 (H_{storage} , cm), 由公式 (5) 计算乳液的贮存稳定性 ($\text{ES}_{\text{storage}}$, %)。

$$\text{ES}_{\text{storage}}/\% = \frac{H_{\text{storage}}}{H_0} \times 100 \quad (5)$$

1.3.6 包封率和载药率测试

参考 ZHANG 等^[5]的方法并稍作修改。将 0.01 g 乳液冻干样品用 5 mL 体积分数 95% 的乙醇水溶液浸泡 30 min, 经 99 W 超声破碎 15 min 后, 过滤定容至 10 mL, 在 275 nm 波长处测量紫外吸光度, 根据标准曲线 ($y_{\text{LEO}}=0.9353x-0.0028$; $y_{\text{BEO}}=0.865x-0.0127$; $y_{\text{OEO}}=1.5097x-0.0034$; $y_{\text{TEO}}=1.495x+0.0033$ 。 x 为 275 nm 处样品吸光度, y 为样品中精油含量) 计算精油含量 V_0 ; 将 0.01 g 乳液冻干样品用 5 mL 体积分数 95% 乙醇水溶液迅速过滤, 定容至 10 mL 后, 在 275 nm 波长处测量紫外吸光度, 根据标准曲线计算精油的含量 V_1 , 上述定容溶剂均为体积分数 95% 的乙醇水溶液。按式 (6) 计算包封率, 按式 (7) 计算载药率。

$$\text{包封率}/\% = \left(1 - \frac{V_1}{V_0}\right) \times 100 \quad (6)$$

$$\text{载药率}/\% = \frac{V_0}{\text{称取的冻干样品质量}} \times 100 \quad (7)$$

1.3.7 体外释放测试

参考 WANG 等^[14]的方法, 稍作修改。分别将 5 mL 的 LPEO、TPEO、OPEO 和 BPEO 转移到透析袋 (宽 44 mm, 截留相对分子质量 14000) 中, 室温下在 0.01 mol/L PBS 缓冲液中浸泡 7 d。通过监测紫外-可见光谱在 275 nm 处的吸收峰来测量释放精油的含量。通过将每个采样时间点的精油释放量累计得到累计释放量 (M_t , g), 用 M_t 除以样本中精油的初始质量 (M_0 , g), 得出释放率。取样液后, 重新加入 PBS 缓冲液, 以保持试液总体积恒定。释放率由公式 (8) 计算:

$$\text{释放率}/\% = \sum_{t=0}^i \frac{M_t}{M_0} \times 100 \quad (8)$$

1.3.8 抗菌性测试

参考 HUA 等^[15]方法通过滤纸片扩散法评估了 LPEO、TPEO、OPEO、BPEO 的抗菌活性, 在平板计数琼脂上接种 100 μL 的大肠杆菌和金黄色葡萄球菌 (1.0×10^6 cfu/mL), 制成细菌平板。将直径为 6 mm 的无菌滤纸分别在 5 mL 的 LPEO、TPEO、OPEO、BPEO 中浸泡 10 s 后, 放置在制备的细菌平板上。在 37 $^\circ\text{C}$ 下孵育 24 h 后, 使用游标卡尺测量每个圆盘的抑制圈直径。

2 结果与讨论

2.1 柑橘果胶的乳化性和乳化稳定性分析

图 1a、b 分别为 CP 和 MCP 的 FTIR 谱图。

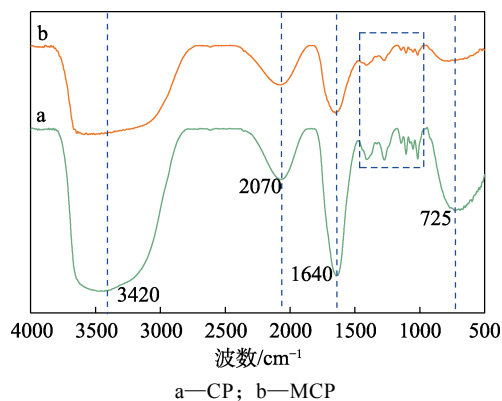


图 1 辐照前后 CP 的 FTIR 谱图
Fig. 1 FTIR spectra of CP before and after irradiation

由图 1 可知, 两者在 3420、2070 和 1640 cm^{-1} 处均存在吸收峰。CP 和 MCP 在 3420 cm^{-1} 处出现的宽吸收带归属于 O—H 键的伸缩振动, MCP 在 3420 cm^{-1} 处的吸收峰强度明显降低, 这是由于辐照过程中产生的羟基自由基攻击分子间或分子内的氢键, 柑橘果胶发生明显解聚所致^[16]。2070 cm^{-1} 处的强吸收峰属于 C=O 的伸缩振动, 1640 和 1416 cm^{-1} 处属于游离羧酸根离子的伸缩振动峰, MCP 在 2070、1640 和 1416 cm^{-1} 处的吸收峰强度降低, 表明柑橘果胶的酯化度降低, 即甲氧基和乙酰基等小基团发生分解。在 1300~800 cm^{-1} 范围内中等强度及弱的吸收峰构成了柑橘果胶的指纹区, MCP 在指纹区内的吸收峰强度降低可能是柑橘果胶侧链中性单糖的链末端发生剪切所致。725 cm^{-1} 处属于 O—H 的面外弯曲振动, MCP 在 725 cm^{-1} 处的吸收峰减弱, 可能是由于羟基自由基夺取了 O—H 的 H 原子所致。通过基团红外吸收峰的强度变化推测 UV+H₂O₂ 法制备 MCP 的反应是一个以羟基自由基主导的柑橘果胶主链和侧链同时发生氧化降解反应的过程。罗司丹^[17]的实验也得出了类似的结论, 并通过降解动力学进一步发现, 在酸性条件下, 果胶的降解依次分为随机断裂、主链断裂和

末端剪切 3 个阶段。上述实验结果表明辐照处理可以有效地降解柑橘果胶分子。

柑橘果胶的乳化性和乳化稳定性见表 1。由表 1 可知, MCP 的乳化性和乳化稳定性明显高于 CP, 乳化性达到 $(548.114 \pm 18.737) \text{ m}^2/\text{g}$ 。这是由于辐照改性降解了 CP, MCP 表现出更低的黏度, 使得分子可以更迅速地吸附到液滴表面, 从而具备更好的乳化性能, PETKOWICZ 等^[18]的实验得出了相同的结论。说明辐照处理是一种有效提高 CP 乳化性能的改性方法。

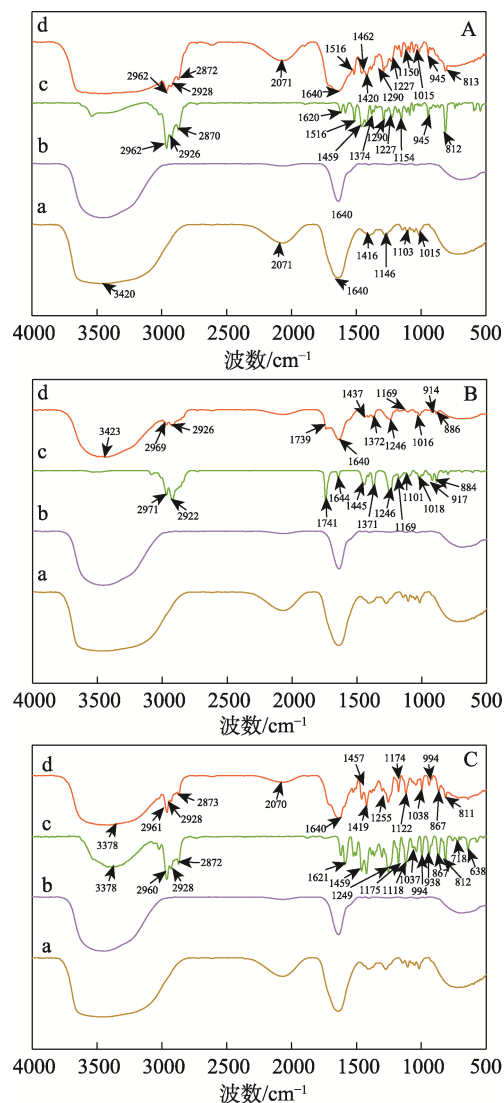
表 1 柑橘果胶的乳化性和乳化稳定性

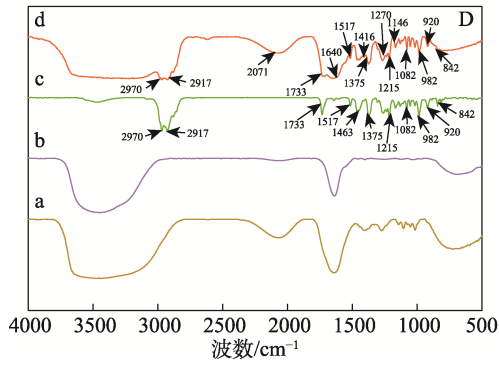
Table 1 Emulsification and emulsification stability of citrus pectin

果胶种类	EAI/(m^2/g)	ESI/min
CP	190.136 ± 20.764	113.340 ± 10.035
MCP	548.114 ± 18.737	169.374 ± 9.093

2.2 红外光谱分析

MCP、WPI、4 种精油和 4 种 Pickering 乳液的 FTIR 谱如图 2 所示。





A—TPEO; B—LPEO; C—BPEO; D—OPEO; a—MCP; b—WPI; c—精油; d—乳液

图 2 Pickering 乳液的 FTIR 谱图

Fig. 2 FTIR spectra of Pickering emulsions

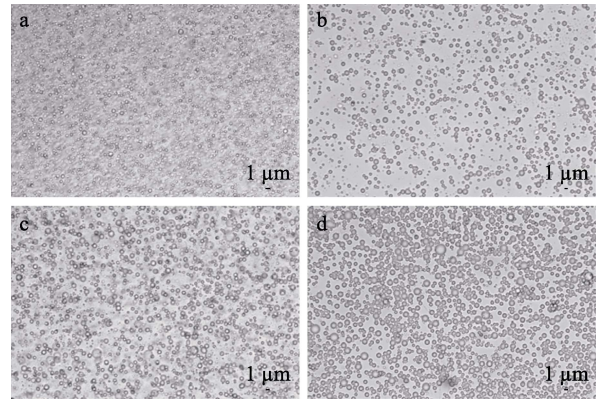
MCP 在 3420 cm^{-1} 左右出现的宽吸收带归属于 O—H 键的伸缩振动峰, 1640 和 1416 cm^{-1} 处的吸收峰属于游离羧酸根离子的伸缩振动, 1015 、 1103 、 1146 cm^{-1} 处的吸收峰分别对应 C—O、C—C、C—O—C 的伸缩振动。WPI 在 1640 cm^{-1} 处的强吸收峰属于肽的 C=O 拉伸振动, 纯精油的 FTIR 谱有许多峰, 包括 3378 cm^{-1} 处炔烃 C—H 键的伸缩振动峰、 $2870\sim 2970\text{ cm}^{-1}$ 处烷烃 C—H 的伸缩振动峰、 1733 和 1741 cm^{-1} 处酸酐的羰基 C=O 伸缩振动峰、 $1620\sim 1644\text{ cm}^{-1}$ 处烯烃 C=C 键的伸缩振动峰、 $1516\sim 1517\text{ cm}^{-1}$ 处芳香烃 C=C 键的伸缩振动峰、 1462 cm^{-1} 处烷烃 C—H 键的弯曲振动峰、 $1372\sim 1375\text{ cm}^{-1}$ 处醇酚 O—H 键的伸缩振动峰、 $1215\sim 1290\text{ cm}^{-1}$ 处芳香烃 C—H 的伸缩振动峰、 $1150\sim 1169\text{ cm}^{-1}$ 处醇酚 C—O 键的伸缩振动峰、 $1015\sim 1018\text{ cm}^{-1}$ 处苯环 C—H 的面外弯曲振动峰、 $914\sim 945\text{ cm}^{-1}$ 处烯基 C—H 键的弯曲振动峰、 $812\sim 886\text{ cm}^{-1}$ 处苯环的 C—H 面内弯曲振动峰。这归因于精油中存在的如醇类、酚类、萜烯类等多种成分, 所有上述特征峰均出现在对应的负载精油的 Pickering 乳液的 FTIR 谱中, 但波数略有移动, 且乳液图谱中精油的特征峰出现明显的减弱或消失, 说明精油都已成功负载到 MCP-WPI 复合颗粒中。

2.3 乳液的微观形态、粒径分布及 Zeta 电位分析

对 Pickering 乳液进行光学形态观察, 结果如图 3 所示。TPEO、BPEO、OPEO 大部分乳液液滴的粒径都在 $1\text{ }\mu\text{m}$ 以内, 形成了纳米乳液; LPEO 液滴大小则明显高于其他 3 种乳液, 乳液粒径从小到大分布顺序为: TPEO<BPEO<OPEO<LPEO。由图 3 可知, 4 种乳液都形成了较小的乳液液滴且分布较为均匀。这表明 MCP 和 WPI 复合的固体颗粒能有效地作为负载精油的 Pickering 乳液的稳定剂。

通过 SEM 图观察 Pickering 乳液颗粒的微观形

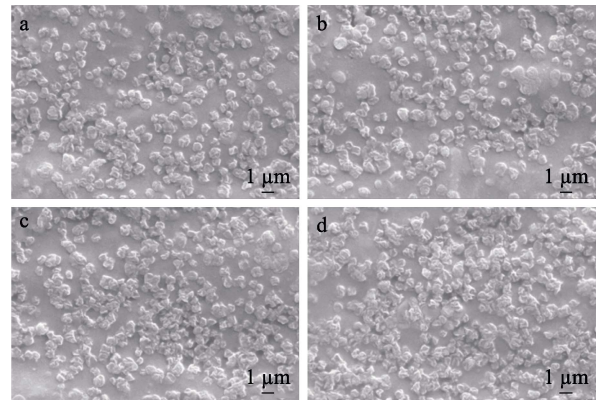
貌, 结果如图 4 所示。由图 4 可知, 乳液颗粒形态相似, 大部分为球形个体, 分散均匀。其中, TPEO 颗粒较小, BPEO、OPEO 和 LPEO 的颗粒较大, 与显微镜的测试结果相一致。4 种乳液颗粒表面光滑, 结构完整, 表明精油成功地包被于 MCP-WPI 复合颗粒中, 这与红外光谱的结果一致。



a—TPEO; b—BPEO; c—OPEO; d—LPEO

图 3 Pickering 乳液的显微镜图

Fig. 3 Microscopic images of Pickering emulsions



a—TPEO; b—BPEO; c—OPEO; d—LPEO

图 4 Pickering 乳液的 SEM 图

Fig. 4 SEM images of Pickering emulsions

4 种负载精油的 Pickering 乳液的粒径分布如图 5、表 2 所示。结合图 5 和表 2 可知, 4 种乳液的平均粒径处于 $829\sim 1147\text{ nm}$ 范围内, 且粒径从小到大顺序为 TPEO<BPEO<OPEO<LPEO, 这与显微镜结果一致。PDI 越大表示乳液粒径分布越宽, 数值越小表示粒径分布越均匀^[7]。由表 2 可知, 4 种乳液的 PDI 从小到大顺序为 LPEO<TPEO<OPEO<BPEO, 最低值约 0.228, 最高值约 0.457。Zeta 电位是对颗粒之间排斥力强度的度量, Zeta 电位绝对值越大, 颗粒之间的排斥力就越大, 进而可减缓乳液的聚合和絮凝。由表 2 可知, 4 种乳液的 Zeta 电位绝对值从小到大顺序为 LPEO<OPEO<BPEO<TPEO, 最低绝对值约 0.867, 最高绝对值约 9.063。上述结果表明,

LPEO、TPEO、OPEO、BPEO 粒径较小且均具有良好的分散性, 但乳液的具体特性具有较大差异。

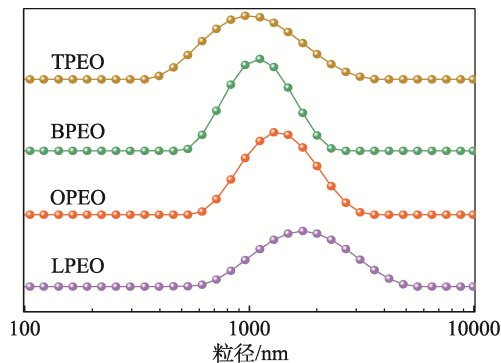


图 5 Pickering 乳液的粒径分布图

Fig. 5 Particle size distribution of Pickering emulsions

表 2 Pickering 乳液的粒径、PDI 和 Zeta 电位

Table 2 Particle size, PDI, Zeta potential of Pickering emulsions

乳液种类	粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV
BPEO	960.70±20.76	0.457±0.035	-2.173±0.154
TPEO	829.33±29.10	0.254±0.064	-9.063±0.879
OPEO	991.20±10.71	0.343±0.082	-1.510±0.315
LPEO	1147.00±18.73	0.228±0.093	-0.867±0.067

同一制备条件下特性不同的乳液与包埋的精油有关, 精油的极性、相对分子质量和构象等对乳液的性质都有影响^[19]。例如, 极性高的精油可通过降低油水比例缩小乳液的粒径。这是由于水相的颗粒浓度一致时, 油水比例高会导致界面上的颗粒难以充分覆盖界面, 油滴会聚集缩小界面面积, 导致产生的液滴粒径较大。这可能是 LPEO 粒径较大的原因^[20]。同时, 颗粒不足时, 油滴会共用颗粒达到稳定^[8], 即图 3d 中 LPEO 部分液滴相互紧挨的状态, 因此, LPEO 粒径分布集中, PDI 最低。TPEO 则是在足够固体颗粒的存在下, 形成了均匀分散的乳液液滴, OPEO 和 BPEO 形成液滴大小不一, 导致在一定范围内粒径分布较宽。Zeta 电位的差异也与精油的性质有关, OUN 等^[21]使用纤维素纳米晶体包封 OEO 和肉桂精油也得到了不同的 Zeta 电位。因此, 推测由于包埋的精油性质不同导致了乳液的粒径、PDI 和 Zeta 电位具有差异性。

2.4 流变学分析

LPEO、TPEO、OPEO、BPEO 的剪切速率扫描结果如图 6a 所示。由图 6a 可知, 在 0.1~100 s⁻¹ 的范围内, 随着剪切速率的增加, 4 种乳液的黏度都呈现出下降的趋势, 发生了剪切稀化流动^[22]。这说明 4 种乳液都属于假塑性流体^[23]。由图 6a 还可以看出, 不同乳液之间黏度具有差异, 从大到小顺序为

LPEO>TPEO>OPEO>BPEO, 这是由于精油的黏度不同所致。精油的黏度受精油组成成分的含量影响, 如 FLORIDO 等^[24]发现, 精油的黏度与其萜烯类衍生物的含量有关, 芳樟醇和对伞花烃含量高的精油如 LEO 和 TEO, 其黏度相对较高。综上可知, MCP-WPI 复合颗粒包埋 LEO、TEO、OEO、BEO 后, 形成了不同黏度的假塑性流体 LPEO、TPEO、OPEO、BPEO。

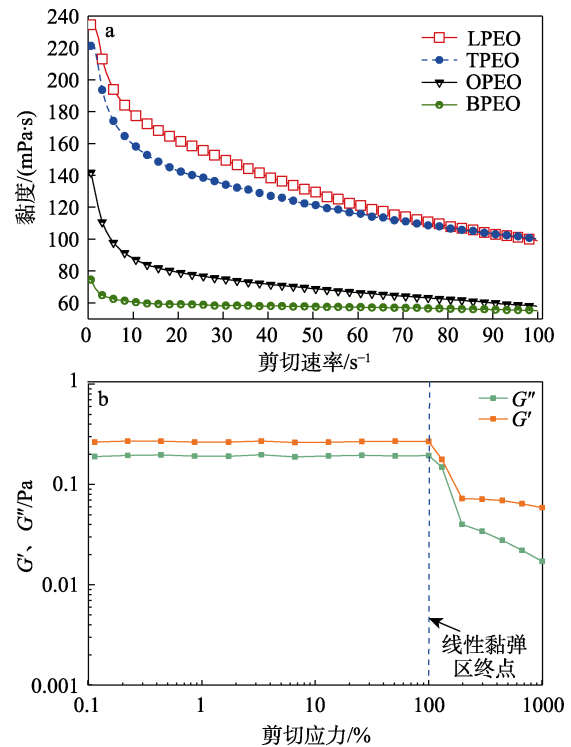
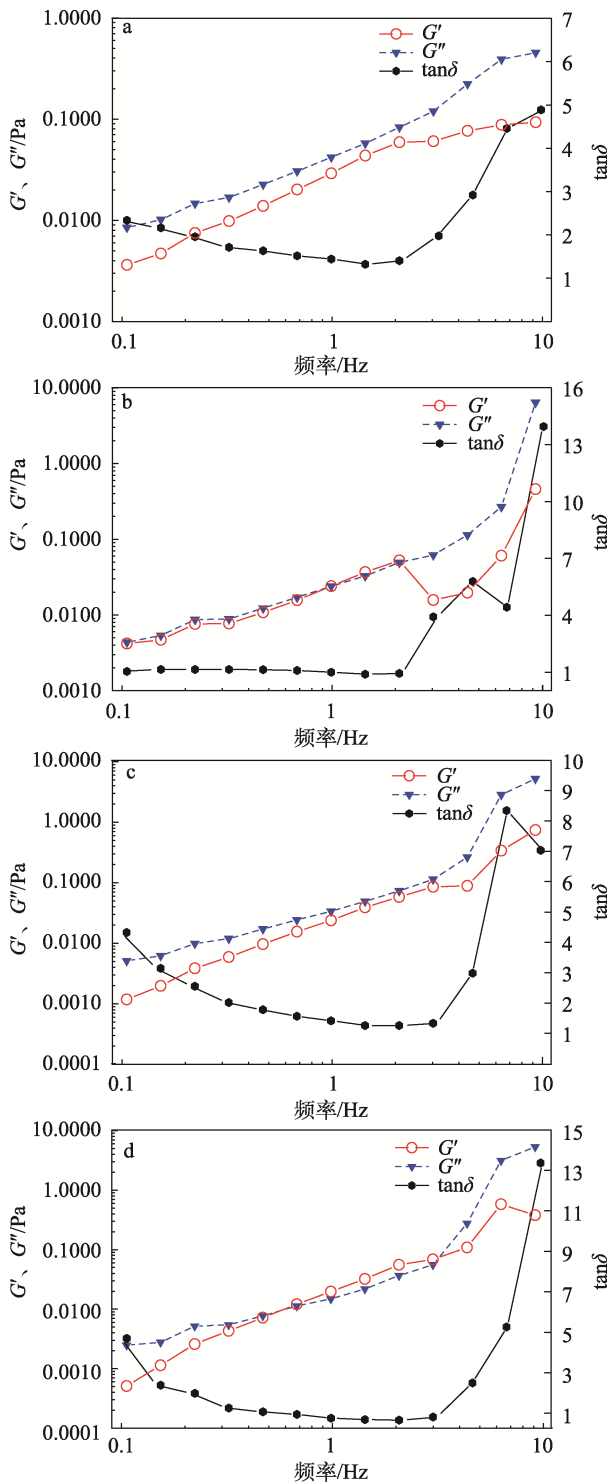


图 6 Pickering 乳液的黏度变化 (a) 及 TPEO 的剪切应变扫描 (b)

Fig. 6 Viscosity changes of Pickering emulsions (a) and shear strain sweeps of TPEO (b)

剪切应变扫描通常用于反映界面抵抗剪切的能力, 与 Pickering 乳液的乳化剂密切相关^[25]。4 种乳液的乳化剂相同, 选取 TPEO 进行剪切应变扫描, 结果如图 6b 所示。由图 6b 还可知, 在 0.1%~100% 的范围内, 随着剪切应力的增加, 界面的黏性模量 (G'') 和弹性模量 (G') 没有明显变化, 且样品的 G'' 始终大于 G' , 表明 TPEO 黏性行为占主导地位^[26]。线性黏弹区的终点表示超过这个值时, 乳液会由于分子链之间相互缠结的断裂开始失稳。由图 6b 可知, 剪切应力 100% 是 TPEO 线性黏弹区的终点, TPEO 形成的线性黏弹性区域非常宽, 这表明 MCP-WPI 复合颗粒稳定的界面层具有良好的抗剪切能力。

对 TPEO、OPEO、LPEO、BPEO 进行振荡频率扫描, 结果如图 7 所示。



a—TPEO; b—OPEO; c—LPEO; d—BPEO
图 7 Pickering 乳液的 G' 、 G'' 及 $\tan\delta$ 变化

Fig. 7 Changes of G' , G'' and $\tan\delta$ of Pickering emulsions

由图 7 可知，在 0.1~10 Hz 的频率范围内，TPEO、OPEO、LPEO、BPEO 的 G'' 和 G' 随着频率的增高都有所变化，表明 4 种乳液的黏弹性均具有频率依赖性^[27]。损耗角正切值 ($\tan\delta$) 为 G'' 和 G' 的比值，反映乳液黏性模量和弹性模量的关系。由图 7a、c 可知，TPEO、LPEO 的 $\tan\delta$ 始终大于 1，说明 TPEO、LPEO 的黏性模量始终大于弹性模量，

为类液体乳液^[28]。由图 7b、d 可知，OPEO 和 BPEO 的 $\tan\delta$ 基本大于 1，为类液体乳液，但 G' 和 G'' 线条短暂地出现了两次交叉。结合图 6a 中剪切频率扫描结果分析可知，这是由于 OPEO、BPEO 的黏度较低，分子链缠结程度较低所致。在低频率下，测试时间长于分子链的松弛时间，分子链弹性反应增加，流向新的构象，乳液由类液态转化为类固态，出现第一个交点；而在较高频率下，由于测试时间太短，链没有足够的时间流动，乳液的弹性反应减弱，逐渐从类固态向类液态转化，出现第二个交点^[29]。综上所述，TPEO、OPEO、LPEO、BPEO 的黏弹性都具有频率依赖性，且 4 种乳液均为类液体乳液。

2.5 乳液的稳定性分析

乳液的稳定性实验结果如表 3、4 所示。由表 3 可知，BPEO、TPEO、LPEO、OPEO 的 ES_{15} 均大于 82%， ES_{60} 均大于 68%，这表明 4 种乳液都有抗机械破乳的能力。结合表 3 的贮存稳定性结果可知，在贮存 77 d 后，BPEO、TPEO、LPEO、OPEO 稳定性都高于 91%，说明 4 种乳液均具有长期稳定性。由表 4 可知，贮存期间，TPEO 和 OPEO 的粒径变化较小，贮存 77 d 后分别增加了约 36 和 93 nm，其中，TPEO 在 7~77 d 的粒径均未发生显著变化；LPEO 和 BPEO 的粒径变化较大，贮存 77 d 后分别增加了约 200 和 208 nm。由表 3、4 可知，4 种乳液的离心稳定性、贮存稳定性和粒径变化具有一致性，粒径变化小的乳液稳定性高，乳液的稳定性从大到小顺序为 TPEO>OPEO>LPEO>BPEO。4 种乳液的稳定性具有差异，这是因为乳液的稳定性是由多种因素如乳液的粒径、Zeta 电位绝对值、黏度等共同作用的结果。乳液的初始粒径小，乳液的油相难以析出；乳液的 Zeta 电位绝对值大，乳液液滴之间有强排斥力抵抗液滴的聚集；乳液的黏度高，乳液液滴的碰撞速率低。因此，粒径小、Zeta 电位高、黏度高的乳液通常更稳定^[30]。结合 2.3 节和 2.4 节的实验结果可知，TPEO 的初始粒径最小，分散性良好，有较高的黏度和最高的 Zeta 电位绝对值，因此 TPEO 稳定性最高。OPEO、BPEO 的初始粒径、Zeta 电位绝对值相近，但 OPEO 的黏度高，所以 OPEO 的稳定性高于 BPEO。LPEO 具有最高的黏度，但其乳液初始粒径最大且液滴之间排斥力最低，无法抵抗分子之间的团聚行为，容易发生聚合进而失稳，因此，LPEO 稳定性介于 OPEO 和 BPEO 之间。乳液的稳定性分析结果表明，BPEO、TPEO、LPEO、OPEO 均具有高稳定性。

表 3 Pickering 乳液的离心和贮存稳定性
Table 3 Centrifugation and storage stability of Pickering emulsions

乳液种类	乳液稳定性						
	离心稳定性		贮存稳定性/%				
	ES ₁₅ /%	ES ₆₀ /%	21 d	35 d	49 d	63 d	77 d
BPEO	82.98	68.09	95.95	94.86	94.59	92.95	91.78
TPEO	91.67	79.17	97.97	97.30	96.62	96.32	95.93
LPEO	87.50	72.92	97.26	95.89	95.21	93.44	91.88
OPEO	89.58	76.04	97.60	96.67	96.27	95.83	93.91

表 4 贮存过程中 Pickering 乳液的粒径变化 (单位 nm)
Table 4 Particle size change of Pickering emulsions during storage

乳液种类	贮存时间/d									
	0	7	14	21	28	35	42	49	56	77
OPEO	991.20±10.71 ^c	1038.67±20.65 ^{bc}	1089.33±32.58 ^b	1018.63±18.09 ^c	1023.00±19.52 ^c	1044.67±25.58 ^{bc}	1046.33±27.59 ^{bc}	1164.33±53.45 ^a	1168.67±36.56 ^a	1084.67±9.45 ^a
TPEO	829.33±29.10 ^b	863.97±10.56 ^a	879.63±6.80 ^a	868.93±14.76 ^a	869.17±8.57 ^a	862.87±13.11 ^a	882.77±13.04 ^a	876.97±11.06 ^a	886.10±11.31 ^a	865.67±8.16 ^a
LPEO	1147.00±18.73 ^d	1266.67±73.10 ^{ab}	1339.67±18.01 ^a	1284.00±74.10 ^a	1289.33±58.02 ^{ab}	1237.67±21.73 ^{bc}	1054.00±43.00 ^c	1014.00±26.15 ^e	1176.33±35.73 ^{cd}	1347.67±22.59 ^a
BPEO	960.70±20.76 ^{de}	987.07±16.99 ^{de}	1037.00±16.97 ^{bc}	1095.00±18.19 ^a	955.00±35.37 ^{de}	945.33±29.57 ^c	885.47±25.96 ^f	943.67±26.16 ^e	1001.00±12.49 ^{cd}	1168.33±19.86 ^{ab}

注: 表中同行数据后面字母相同表示差异不显著, 不同表示差异显著($p < 0.05$)。

2.6 乳液的封装性能、负载性能及缓释性能分析

4 种 Pickering 乳液的封装率和载药率如图 8a 所示。由图 8a 可知, MCP-WPI 复合颗粒对 4 种精油的封装能力和负载能力从小到大顺序为 BPEO<LPEO<OPEO<TPEO。乳液对不同精油的封装率在 5.82%~21.54%之间, 载药率在 0.86%~5.25%之间。TPEO 和 OPEO 的封装性能和负载性能较高, LPEO 和 BPEO 的封装性能和负载性能较低, 这与精油特性有关。精油特性不同, 它们形成乳液所需的油水比例不同, 采用不合适的油水比例会影响乳液的性能^[19]。对于 LPEO 和 BPEO 而言, $V(\text{精油}): V(\text{MCP-WPI 溶液})=1:2$ 可能过高, MCP-WPI 复合颗粒不足以覆盖 LEO 和 BEO, 导致 LPEO 和 BPEO 的封装性能和负载性能下降。此外, 精油是挥发性物质, 油水比例过高, 大量的精油位于乳液颗粒的表面, 可能在洗涤步骤和干燥步骤中挥发, 导致 LPEO 和 BPEO 的封装率和载药率下降。图 8a 表明, MCP-WPI 复合颗粒对 4 种精油均能实现有效地封装和负载。

4 种 Pickering 乳液颗粒中负载的精油体外释放曲线如图 8b 所示。由图 8b 可知, 透析 7 d 后 OPEO、TPEO、LPEO 和 BPEO 释放率分别为 87.19%、80.25%、15.61%、3.35%, 这表明 OPEO、TPEO、LPEO、BPEO 中负载的精油并没有完全释放。其中, OPEO、TPEO 的体外释放曲线可以描述为最初的爆发性释放和随后的缓慢释放。最初的爆发性释放是由于精油分子吸附在乳液颗粒的表面, 由于乳液颗粒表面溶解率高, 精油释放量也高^[31]。如图 8b 所示, 在第一阶段, 即透析的前 5 d, OPEO、TPEO 和 LPEO 分别释放了

87.17%的 OEO、80.02%的 TEO 和 15.51%的 LEO, 其中 OPEO 和 TPEO 释放速率极快。这是由于 OPEO 和 TPEO 粒径较小所致。因为粒径较小的乳液颗粒有更大的相对比表面积, 吸附在乳液颗粒表面的精油会快速释放。

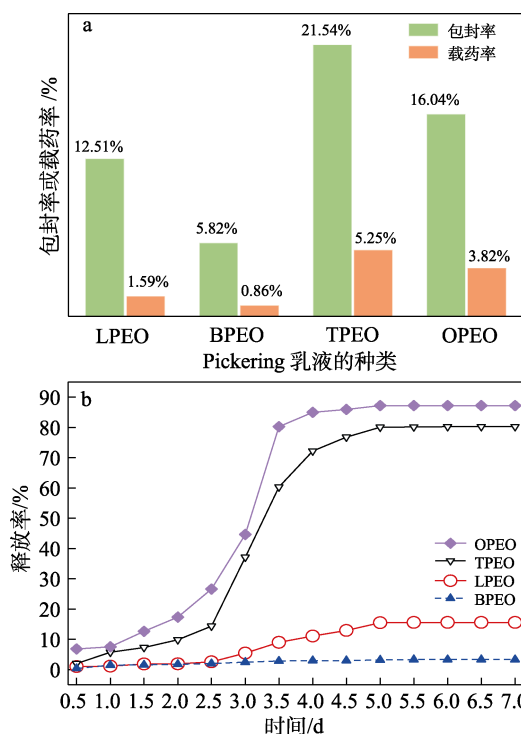


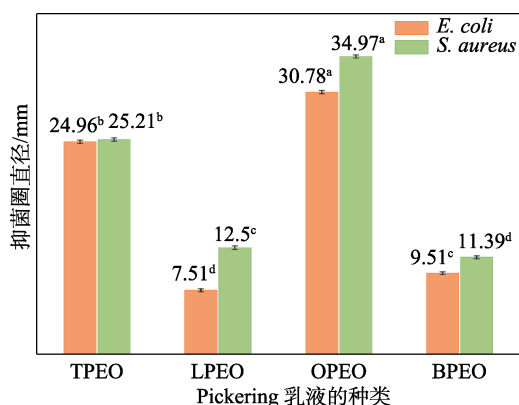
图 8 乳液颗粒的封装率和载药率 (a) 及乳液颗粒的体外释放曲线 (b)

Fig. 8 Encapsulation efficiency and drug-loading capacity of Pickering emulsions (a) and *in vitro* release profiles of Pickering emulsions (b)

OPEO 的粒径大于 TPEO, 但释放速率高于 TPEO, 这是由于 OPEO 的黏度远远低于 TPEO, 分子间的碰撞速率更高, 导致 OPEO 释放速率更快。LPEO 粒径最大且具有最高的黏度, 因此其释放速率显著低于 OPEO 和 TPEO。在第二阶段, 即透析的 5~7 d, OPEO、TPEO 和 LPEO 释放速率相对缓慢, 精油的释放达到了平稳。此阶段以包埋在 MCP-WPI 复合颗粒中的精油的扩散为主导, 精油的进一步释放需要 MCP-WPI 复合颗粒的膨胀和分解, 因此, 释放速度平缓。由图 8b 可知, BPEO 的释放十分平缓, 最终释放率仅为 3.35%, 这可能是由于 BPEO 载药率较低 (如图 8a 所示), 乳液颗粒表面及内部没有吸附足够的精油分子所致。综上可知, MCP-WPI 复合颗粒适用于控制 LEO、TEO、BEO 和 OEO 的体外释放。

2.7 抗菌性分析

TPEO、BPEO、LPEO 和 OPEO 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抗菌效果如图 9 所示。



注: 上标是代表不同的乳液的抑菌性显著性差异, 不同字母表示差异性显著

图 9 Pickering 乳液对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抗菌效果

Fig. 9 Bactericidal effects of Pickering emulsions on *E. coli* and *S. aureus*

由图 9 可知, 4 种乳液对这两种细菌均具有敏感性, 抑菌圈直径为 7.51~34.97 mm, 且对金黄色葡萄球菌的抑菌能力高于大肠杆菌。这是由于两种细菌细胞壁结构差异所致。大肠杆菌的细胞壁呈现出多层结构, 其中最外层的膜含有肽聚糖、脂蛋白、磷脂等, 而金黄色葡萄球菌的细胞壁仅被单一的肽聚糖层包围^[32]。因此, 乳液颗粒更容易穿过金黄色葡萄球菌的细胞壁起到抗菌作用。此外, 4 种乳液的抗菌活性大小具有差异, OPEO 和 TPEO 的抗菌效果明显优于 BPEO 和 LPEO。这与精油的组成成分有关, OEO 和 TEO 的主要成分为香芹酚和百里香酚, BEO 和 LEO 的主要成分为柠檬烯^[19]。香芹

酚和百里香酚能够通过降低转录水平抑制金黄色葡萄球菌等食源性细菌的生物被膜的形成, 也可以通过破坏细菌的细胞膜结构, 影响细菌的侵入能力, 达到抑菌效果^[33], 而柠檬烯对于这两种细菌的敏感性相对较低^[20]。结合 2.6 节的结果, BPEO 和 LPEO 的载药率低也会导致其抗菌活性下降。因此, OPEO 和 TPEO 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌性能比 BPEO 和 LPEO 更好。

3 结论

(1) 对 CP 进行辐照改性, FTIR 谱显示, 羟基自由基和柑橘果胶基团发生了相互作用, 提高了 CP 的乳化能力和乳化稳定性。

(2) 以 MCP-WPI 复合颗粒对 LEO、TEO、OEO 和 BEO 进行包埋, 在 $V(\text{精油}) : V(\text{MCP-WPI 溶液}) = 1 : 2$ 的情况下, 制备的乳液颗粒大小在 829~1147 nm 之间, 形成了 4 种纳米乳液 LPEO、TPEO、OPEO 和 BPEO。SEM 图中表面光滑、结构完整的乳液颗粒印证了 MCP-WPI 复合颗粒对精油的包封, 且包封率最高可达 21.54%, 表明 MCP-WPI 复合颗粒构建的 Pickering 乳液是一种潜在的药物递送体系。4 种乳液均能稳定贮存 77 d, 表明 MCP-WPI 复合颗粒制备的精油 Pickering 乳液具有长期贮存稳定性。流变学测试中乳液发生剪切稀化, 表明乳液为假塑性流体。体外释放实验中乳液颗粒透析 7 d 后仍能保留药物, 即稳定剂均可在油滴表面形成致密固体颗粒阻止精油的快速挥发释放, 表明 MCP-WPI 复合颗粒对精油具有控释作用。药敏实验结果表明, 4 种乳液对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌具有明显的抑菌作用。

(3) 本研究结果能为以 MCP-WPI 复合颗粒为基础的 Pickering 乳剂的设计和使用提供一定的依据, 为多种天然活性成分的包埋递送提供了理论支持和技术路线。

参考文献:

- [1] HE L, HU J, DENG W J. Preparation and application of flavor and fragrance capsules[J]. *Polymer Chemistry*, 2018, 9(40): 4926-4946.
- [2] TONGNUANCHAN P, BENJAKUL S. Essential oils: Extraction, bioactivities, and their uses for food preservation[J]. *Journal of Food Science*, 2014, 79(7): R1231-R1249.
- [3] ALVAREZ-MARTINEZ F J, BARRAJON-CATALAN E, HERRANZ-LOPEZ M, *et al.* Antibacterial plant compounds, extracts and essential oils: An updated review on their effects and putative mechanisms of action[J]. *Phytomedicine*, 2021, 90: 153626.
- [4] WU Z G, ZHOU W, PANG C S, *et al.* Multifunctional chitosan-based coating with liposomes containing laurel essential oils and nanosilver for pork preservation[J]. *Food Chemistry*, 2019, 295: 16-25.
- [5] ZHANG Z, ZHANG S S, SU R R, *et al.* Controlled release mechanism and antibacterial effect of layer-by-layer self-assembly thyme oil microcapsule[J]. *Journal of Food Science*, 2019, 84(6): 1427-1438.

- [6] XIONG Y, LI S M, WARNER R D, *et al.* Effect of oregano essential oil and resveratrol nanoemulsion loaded pectin edible coating on the preservation of pork loin in modified atmosphere packaging[J]. *Food Control*, 2020, 114: 107226.
- [7] ALMASI H, AZIZI S, AMJADI S. Development and characterization of pectin films activated by nanoemulsion and Pickering emulsion stabilized marjoram (*Origanum majorana* L.) essential oil[J]. *Food Hydrocolloids*, 2020, 99: 105338.
- [8] SHI A M, FENG X Y, WANG Q, *et al.* Pickering and high internal phase Pickering emulsions stabilized by protein-based particles: A review of synthesis, application and prospective[J]. *Food Hydrocolloids*, 2020, 109: 106117.
- [9] XU Y Y, CHU Y F, FENG X, *et al.* Effects of zein stabilized clove essential oil Pickering emulsion on the structure and properties of chitosan-based edible films[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 156: 111-119.
- [10] ZHOU Y, SUN S S, BEI W Y, *et al.* Preparation and antimicrobial activity of oregano essential oil Pickering emulsion stabilized by cellulose nanocrystals[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 112: 7-13.
- [11] WANG Y T, LI B, ZHU L B, *et al.* Octenyl succinic acid starch-stabilized vanilla essential oil Pickering emulsion: Preparation, characterization, antioxidant activity, and storage stability[J]. *Foods*, 2022, 11(7): 987-1015.
- [12] RAHMANI Z, KHODAIYAN F, KAZEMI M, *et al.* Optimization of microwave-assisted extraction and structural characterization of pectin from sweet lemon peel[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 147: 1107-1115.
- [13] DUAN X, LI M, SHAO J, *et al.* Effect of oxidative modification on structural and foaming properties of egg white protein[J]. *Food Hydrocolloids*, 2018, 75: 223-228.
- [14] WANG W H, HAO X P, CHEN S G, *et al.* pH-responsive capsaicin@chitosan nanocapsules for antibiofouling in marine applications[J]. *Polymer*, 2018, 158: 223-230.
- [15] HUA L, DENG J Y, WANG Z M, *et al.* Improving the functionality of chitosan-based packaging films by crosslinking with nanoencapsulated clove essential oil[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 192: 627-634.
- [16] HU W W, CHEN S G, WU D M, *et al.* Ultrasonic-assisted citrus pectin modification in the bicarbonate-activated hydrogen peroxide system: Chemical and microstructural analysis[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2019, 58: 104576.
- [17] LUO S D (罗司丹). Modification of citrus pectin by UV-catalyzed hydrogen peroxide oxidation reaction and its structure and bioactivities[D]. Guangzhou: South China University of Technology (华南理工大学), 2020.
- [18] PETKOWICZ C L O, VRIESMANN L C, WILLIAMS P A. Pectins from food waste: Extraction, characterization and properties of watermelon rind pectin[J]. *Food Hydrocolloids*, 2017, 65: 57-67.
- [19] ABDOLMALEKI K, MOHAMMADIFAR M A, SHEIKHI Z, *et al.* The role of oil phase in the stability and physicochemical properties of oil-in-water emulsions in the presence of gum tragacanth[J]. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 2019, 96(7): 795-803.
- [20] RAI M, PARALIKAR P, JOGEE P, *et al.* Synergistic antimicrobial potential of essential oils in combination with nanoparticles: Emerging trends and future perspectives[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2017, 519(1/2): 67-78.
- [21] OUN A A, SHIN G H, KIM J T. Multifunctional poly(vinyl alcohol) films using cellulose nanocrystals/oregano and cellulose nanocrystals/cinnamon Pickering emulsions: Effect of oil type and concentration[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022, 194: 736-745.
- [22] WANG H X, HU L D, DU J, *et al.* Development of rheologically stable high internal phase emulsions by gelatin/chitoooligosaccharide mixtures and food application[J]. *Food Hydrocolloids*, 2021, 121: 107050.
- [23] GONG J, WANG L, WU J, *et al.* The rheological and physicochemical properties of a novel thermosensitive hydrogel based on konjac glucomannan/gum tragacanth[J]. *LWT*, 2019, 100: 271-277.
- [24] FLORIDO P M, ANDRADE I M G, CAPELLINI M C, *et al.* Viscosities and densities of systems involved in the deterpenation of essential oils by liquid-liquid extraction: New UNIFAC-VISCO parameters[J]. *Journal of Chemical Thermodynamics*, 2014, 72: 152-160.
- [25] WANG T, WANG N, LI N, *et al.* Effect of high-intensity ultrasound on the physicochemical properties, microstructure, and stability of soy protein isolate-pectin emulsion[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2022, 82: 105871.
- [26] ZHANG F, CAI X X, DING L, *et al.* Effect of pH, ionic strength, chitosan deacetylation on the stability and rheological properties of O/W emulsions formulated with chitosan/casein complexes[J]. *Food Hydrocolloids*, 2021, 111: 106211.
- [27] ROQUE A M, MONTINOLA D, GEONZON L, *et al.* Rheological elucidation of the viscoelastic properties and network interaction of mixed high-methoxyl pectin and KAPPA-carrageenan gels[J]. *Food Hydrocolloids*, 2022, 129: 107647.
- [28] YILMAZ-TURAN S, LOPEZ-SANCHEZ P, JIMENEZ-QUERO A, *et al.* Revealing the mechanisms of hydrogel formation by laccase crosslinking and regeneration of feruloylated arabinoxylan from wheat bran[J]. *Food Hydrocolloids*, 2022, 128: 107575.
- [29] WANG S N, YANG J J, SHAO G Q, *et al.* Soy protein isolated-soy hull polysaccharides stabilized O/W emulsion: Effect of polysaccharides concentration on the storage stability and interfacial rheological properties[J]. *Food Hydrocolloids*, 2020, 101: 105490.
- [30] XU W, XIONG Y Z, LI Z F, *et al.* Stability, microstructural and rheological properties of complex prebiotic emulsion stabilized by sodium caseinate with inulin and konjac glucomannan[J]. *Food Hydrocolloids*, 2020, 105: 105772.
- [31] FAIDI A, LASSOUED M A, BECHEIKH M E, *et al.* Application of sodium alginate extracted from a Tunisian brown algae *Padina pavonica* for essential oil encapsulation: Microspheres preparation, characterization and in vitro release study[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 136: 386-394.
- [32] SIRIPATRAWAN U, VITCHAYAKITTI W. Improving functional properties of chitosan films as active food packaging by incorporating with propolis[J]. *Food Hydrocolloids*, 2016, 61: 695-702.
- [33] KACHUR K, SUNTRES Z. The antibacterial properties of phenolic isomers, carvacrol and thymol[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2020, 60(18): 3042-3053.