

柚皮苷纳米乳化体系的制备及其稳定性研究

程 喆 潘思轶

华中农业大学食品科学技术学院/华中农业大学环境食品学重点实验室, 武汉 430070

摘要 为了构建安全高效的柚皮苷营养递送系统,以乳清分离蛋白(WPI)为乳化剂,系统地研究了柚皮苷单层纳米乳液(NA/WPI-e)及加入 ϵ -卡拉胶和阿拉伯胶的双层乳液的制备条件,并考察了柚皮苷单层、双层纳米乳液在不同环境条件下的稳定性。结果表明:NA/WPI-e 的最佳工艺参数为 WPI 质量浓度 5 g/100 mL,油水体积比 10:90,高压微射流均质压力 68.95 MPa,循环 3 次,此时的 NA/WPI-e 的柚皮苷包埋率高达 75.50%;对于添加 ϵ -卡拉胶和阿拉伯胶二次均质制备的双层纳米乳液,阿拉伯胶和 ϵ -卡拉胶质量浓度均为 0.3 g/100 mL 的双层纳米乳液中的柚皮苷包埋率最高,分别为 69.80%和 64.78%。但在 100 °C 水浴 10 min 和不同 NaCl 浓度环境下,柚皮苷双层纳米乳液粒径较 NA/WPI-e 显著降低($P < 0.05$);在贮藏 35 d 后,柚皮苷双层纳米乳液的液滴颗粒增长率较 NA/WPI-e 显著降低($P < 0.05$),贮藏稳定性随着 ϵ -卡拉胶和阿拉伯胶浓度的增加而逐渐提高,且添加 ϵ -卡拉胶的双层乳液具有更高的离子稳定性和贮藏稳定性。柚皮苷双层纳米乳液提高了 NA/WPI-e 在其等电点处的稳定性。研究结果表明,加入阿拉伯胶和 ϵ -卡拉胶后,制备的双层纳米乳液的物理稳定性更好,可以对柚皮苷形成更好的保护。

关键词 柚皮苷; 纳米乳液; 乳清分离蛋白; ϵ -卡拉胶; 阿拉伯胶; 稳定性

中图分类号 TS 201.7 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2019)04-0093-10

柚皮苷(naringin, NA)是柑橘类水果中一种极具代表性的天然黄酮化合物。柚皮苷因具有抗氧化^[1]、抗癌^[2]、缓解糖尿病^[3]、抗骨质疏松^[4]、抗炎^[5]、抗动脉粥样硬化^[6]等药理作用及生物活性而广受关注。尽管柚皮苷在体外试验中表现出良好的生物活性,但是其在水中的溶解度和人体内的吸收率很低,导致口服柚皮苷的生物利用效率极低,这在很大程度上限制了其在食品领域的开发利用^[7]。为此研究者们通过制备柚皮苷环糊精包合物、卵磷脂复合物、纳米微粒、酶处理法、脂质体等手段来提高柚皮苷的生物利用率^[8-10]。

近年来,食品、医药等行业已经广泛采用纳米乳化体系进行功能性物质的包埋与递送的方法。纳米乳化体系因其分散相的粒径达到纳米级水平,体系具有较高的热力学稳定性^[11],有利于提高产品的品质以及人体对活性成分的生物利用率。利用高压微射流均质技术制备的纳米乳液具有多种优势,不但操作简便、经济成本低,而且制备的乳液粒径小、稳定性较高^[12]。牛乳清分离蛋白(WPI)作为天然食

品蛋白,成本较低,具有生物相容性、生物降解性及良好的功能性质^[13],可采用 WPI 乳液包埋递送柚皮苷。为了提高纳米乳液的稳定性,可添加与 WPI 所带电荷相反的多糖利用层层静电沉积法(LBL)制备双层纳米乳液^[14]。 ϵ -卡拉胶和阿拉伯胶(GA)均为阴离子多糖,GA 分子中的 $-\text{COO}^-$ 与 ϵ -卡拉胶分子中的 $-\text{SO}_4^-$ 可与蛋白质分子中的 $-\text{NH}^+$ 通过静电结合形成双层乳液膜^[15],从而提高蛋白乳液在极端环境下的稳定性。目前,采用 WPI 构建合适的乳化体系递送柚皮苷的研究还未见报道,也很少见添加阿拉伯胶和 ϵ -卡拉胶制备的双层乳液的研究。

本研究以 WPI 为乳化剂,中链甘油三酯(MCT)为油相,采用高压微射流的均质方法制备柚皮苷纳米乳液体系,并引入阴离子多糖制备双层纳米乳液,对比研究 2 种乳液在不同环境下的稳定性,以期扩大柚皮苷的应用以及 WPI 乳液递送体系的开发提供技术支持。

收稿日期: 2019-04-14

基金项目: 国家自然科学基金项目(30901007);湖北省农业科技创新岗位项目(2016620000001044)

程 喆,硕士研究生。研究方向:食品科学。E-mail: 455322295@qq.com

通信作者: 潘思轶,博士,教授。研究方向:食品品质与安全,农产品加工及贮藏。E-mail: pansiyi@mail.hzau.edu.cn

1 材料与方 法

1.1 试验材料、试剂和仪器

柚皮苷(纯度 $\geq 98\%$),购自武汉科瑞生物技术有限公 司;乳清分离蛋白(纯度 $\geq 98\%$),购自美国 Davisco 食品国际公司;柚皮苷标准品、中链甘油三酯、阿拉伯胶、 ϵ -卡拉胶,购自上海源叶生物科技有限公 司;叠氮化钠,购自天津科密欧试剂有限公司;无水乙醇、氢氧化钠、盐酸、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠等试剂均为分析纯,购自国药集团化学试剂有限公 司。

J-26 XP 高速冷冻离心机,美国 Beckman Counter 公司;Zetasizer Nano-ZS90 光散射粒径分析仪,英国 Malvern 公司;AL204 型分析天平,梅特勒-托利多仪器有限公司;UV-1750 紫外-分光光度计,日本岛津公司;Ultra-Turrax T18 高速分散器,德国 IKA 公司;85-2 磁力搅拌器,常州国华电器有限公司;PHS-3C pH 分析仪,上海雷磁公司;M-110-EH-30 高压微射流纳米均质机,美国 MFIC 公司;Waters 高效液相色谱仪,美国 Waters 公司。

1.2 试验方法

1)标准曲线的绘制。采用 HPLC 方法,色谱条件参考 Zhang 等^[16]的方法。首先测得柚皮苷在无水乙醇中的最大吸收波长为 283 nm。精确称取柚皮苷 1.0 mg,用甲醇分别稀释成质量浓度为 0.25、1.00、2.00、4.00、5.00、10.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准溶液。以标准品溶液浓度(X)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标,进行线性回归,所得的回归方程为: $Y = 23669X + 4839.6$ ($R^2 = 0.999 1$)。结果表明,柚皮苷质量浓度在 0.25~10.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 内呈现良好的线性关系。

2)柚皮苷单层和双层纳米乳液的制备。单层柚皮苷纳米乳液的制备:称取 50 mg 柚皮苷(纯度 $\geq 98\%$)溶于 50 g 中链甘油三酯中,超声处理 20 min 至完全溶解,形成油相。将 WPI 溶于 pH 7.0 的 0.05 mol/L 的磷酸盐缓冲溶液中,室温下搅拌 4 h 后于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏保存,溶胀达 12 h,形成水相。在高速乳化剪切仪的作用下(18 000 r/min, 5 min),将柚皮苷油相缓慢加入到水相中,形成粗乳液。将制备好的粗乳液样品通过动态高压微射流纳米均质机进一步处理,得到纳米乳液。并加入质量分数 0.02% 叠氮化钠,以抑制微生物的生长。双层柚皮苷纳米乳液的制备:在单层纳米乳液的基础上加入不同质

量浓度的阿拉伯胶和 ϵ -卡拉胶溶液,进行二次均质,阿拉伯胶和 ϵ -卡拉胶在乳液中最终质量浓度分别为 0.1、0.2、0.3 g/100 mL。

3)乳液的平均粒径、多分散系数(PDI)和 Zeta 电位测定。参考刘蕾等^[17]的方法。利用马尔文激光粒径仪在 25 $^{\circ}\text{C}$ 下测量柚皮苷纳米乳液的平均粒径、粒径分布规律及 Zeta 电位。样品用磷酸盐缓冲液稀释 500 倍,以防止多次散射效应。设定测量参数为:样品折射率为 1.473;分散剂折射率为 1.330。

4)乳液浊度和离心稳定常数的测定。参考 Wang 等^[18]和 He 等^[19]的方法。采用紫外-可见分光光度计在 500 nm 下测定稀释 500 倍的纳米乳液的浊度,样品池为 1 cm 的石英比色皿。样品稀释 500 倍后,3 000 r/min 离心 10 min,取下层溶液采用紫外-可见分光光度计在 500 nm 处测吸光度,并计算离心稳定常数 K_c 值。

5)柚皮苷包埋率的测定。柚皮苷的含量采用 HPLC 的方法测定。准确吸取 200 μL 的样品,然后依次加入 2 mL 的甲醇和 2 mL 的正己烷(体积比为 1:1)的混合有机相进行萃取。4 000 r/min 离心 6 min 后,除去上清液正己烷,取 1 mL 样品离心(11 650 r/min, 2 min),经有机膜过滤后进行液相色谱分析。利用测得的标准曲线回归方程计算不同条件下柚皮苷的浓度。包埋率计算公式如下:

$$\text{包埋率} = C_1 / C_2 \times 100\%$$

式中: C_1 为纳米乳液中柚皮苷的质量浓度, $\mu\text{g}/\text{mL}$; C_2 为柚皮苷的总质量浓度, $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

6)透射电子显微镜(TEM)测量。样品用蒸馏水稀释 20 倍后,滴加样品至覆盖有碳膜的铜网上。随后滴加体积分数 2% 磷钨酸溶液进行负染色处理,放至通风处干燥后,通过 TEM 观察纳米乳液的形态并拍照。

1.3 数据处理

试验均重复 3 次,结果以“平均值 \pm 标准差”表示,采用 SPSS 20.0 进行显著性分析,使用 Origin 8.0 软件进行绘图。2 组数据间有显著性差异表示为 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 柚皮苷单层纳米乳液的制备

在预试验中发现,当均质次数超过 3 次、均质压力超过 68.95 MPa 时,纳米乳液温度升高,WPI 多肽链之间的疏水作用力在高压和高温的共同作用下

增加,引起分散相聚集^[20],从而导致乳液粒径、多分散系数(PDI)增加且稳定性下降。以下试验中均固定均质压力为 68.95 MPa 并循环 3 次。由于 WPI 的加入量决定是否有足够的蛋白质吸附于均质过程中新生成的油滴表面,这是形成稳定纳米乳液的重要因素,同时油相的加入量可显著影响纳米乳液的物理特性,因此,为获得稳定的乳化体系,研究 WPI 质量浓度和油水体积比对柚皮苷纳米乳液物理稳定性的影响,选择最优制备工艺。

1)WPI 质量浓度对柚皮苷纳米乳液物理特性的影响。表 1 为固定油水体积比为 10 : 90,考察 WPI 质量浓度对柚皮苷纳米乳液物理特性的结果。结果显示,当 WPI 质量浓度分别为 0.5 和 1.0 g/100 mL 时,制备乳液的粒径、PDI、浊度和离心稳定常数(K_e)显著高于其他样品($P < 0.05$),这是由于分散相中的 WPI 质量浓度过低,没有足够的 WPI 吸附

于油-水界面,小液滴易聚合形成粒径较大的液滴。而乳液浊度与分散相的粒径呈正相关,乳液的浊度越大,表明较大粒径的液滴分布越多,且乳液的分布不集中、易分层,从而降低了乳化液的离心稳定性,柚皮苷的包埋率较低。当 WPI 质量浓度增加到 2.0 g/100 mL 时,乳液的粒径、PDI、浊度和 K_e 显著降低($P < 0.05$)。WPI 质量浓度为 5.0 g/100 mL 时,液滴的粒径、浊度最低,柚皮苷的包埋率最高,同时具有良好的离心稳定性和均一性,表明在此浓度下 WPI 在液滴表面已形成紧密的界面膜。图 1 为纳米乳液的粒径分布图。当 WPI 质量浓度为 0.5 g/100 mL 时,图 1 中显示为宽峰且存在双峰;当 WPI 质量浓度为 5.0 g/100 mL 时,纳米乳液的粒径分布显示的峰值明显变窄,表明乳液液滴的分布较为集中。综上考虑,选择质量浓度为 5.0 g/100 mL 的 WPI 制备柚皮苷纳米乳液。

表 1 WPI 质量浓度对乳化液物理特性的影响

Table 1 Effect of protein concentration on the physical properties of emulsions

WPI 质量浓度/ (g/100 mL) WPI concentration	平均粒径 D_{32} /nm Average size D_{32}	多分散系数 PDI	浊度/ m^{-1} Turbidity	离心稳定常数/% K_e	柚皮苷包埋率/% Naringin encapsulation ratio
0.5	325.23±6.76a	0.316±0.05a	64 654±978a	35.87±3.74a	34.02±4.90e
1.0	266.10±2.91b	0.227±0.03b	45 445±404b	27.70±2.63b	47.81±1.50d
2.0	200.87±4.80c	0.151±0.03c	26 139±527c	2.42±0.78d	52.10±0.88c
3.0	190.27±3.29c	0.206±0.03b	24 603±404c	6.24±0.33d	55.81±1.47c
4.0	182.40±2.17d	0.118±0.01c	24 411±460c	2.57±0.78d	69.05±1.02b
5.0	179.60±2.41d	0.143±0.02c	20 880±290d	3.77±0.33d	74.51±2.56a
6.0	189.73±0.93c	0.182±0.02b	24 027±958c	13.20±1.35c	71.90±2.88b

注:字母相同表示差异不显著($P > 0.05$);字母不同表示差异显著($P < 0.05$)。下表同。Note: The same letter indicates that the difference is not significant($P > 0.05$); the different letters indicates significant difference ($P < 0.05$).The same as below.

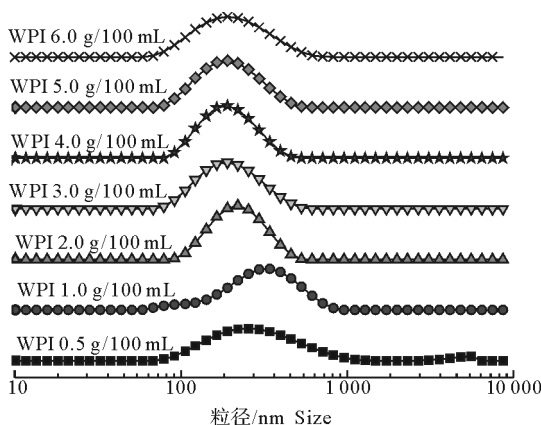


图 1 WPI 质量浓度对纳米乳液粒径分布的影响
Fig.1 Effect of protein content on particle size distribution of nanoemulsion

响。表 2 为固定 WPI 质量浓度为 5.0 g/100 mL,考察油相加入量对柚皮苷纳米乳液物理特性的影响。由表 2 可知,当油水体积比不超过 10 : 90 时,乳液的粒径、PDI 和浊度均较低,柚皮苷包埋率在油水体积比为 10 : 90 时最高,表明此条件下制备的乳液具有良好的包埋率。而当油水体积比大于 10 : 90 时,乳液的粒径和 PDI 均呈现上升趋势并且乳液的浊度显著增加($P < 0.05$)。试验所选油水体积比 5 个水平中,乳液的 K_e 值均小于 20%。随着油水体积比的增加,乳液的 K_e 值逐渐提高。当油水体积比增加至 20 : 80 时,其 K_e 值却反而下降。其原因可能是当乳液中 WPI 质量浓度较高为 5.0 g/100 mL、油水体积比小于 10 : 90 时,WPI 分子可充分地吸附于油滴表面,形成稳定且聚结力强的界面膜,从而

2)油水体积比对柚皮苷纳米乳液物理特性的影

抑制了油相的重新聚合。但当油相体积增加时,由于均质产生的分散相过多,造成维持乳液稳定的 WPI 含量不足,油滴易扩散到大油滴中使乳液粒径升高,从而引起浊度和 K_0 值提高。图 2 中纳米乳液的粒径分布与 PDI 的变化趋势相似。当油水体积比大于 20 : 80 后,柚皮苷纳米乳液粒径分布的峰值变宽且不是单峰,说明过量的油相会影响乳液的

均一性。当油水体积比为 10 : 90 时,纳米乳液粒径分布的峰值宽度最窄。综合考虑得出,10 : 90 的油水体积比最适合柚皮苷纳米乳液的制备。

综上得出,柚皮苷单层纳米乳液的最佳制备工艺参数为:高压微射流均质压力 68.95 MPa,循环 3 次,WPI 质量浓度 5.0 g/100 mL,油水体积比 10 : 90。

表 2 油水体积比对纳米乳液物理性质的影响

Table 2 The influence of oil-to-aqueous ratio on the physical property of nanoemulsions

油水体积比 Oil-to-aqueous ratio(V/V)	平均粒径 D_{32} /nm Average size D_{32}	多分散系数 PDI	浊度/ m^{-1} Turbidity	离心稳定常数/% K_0	柚皮苷包埋率/% Naringin encapsulation ratio
5 : 95	194.43±0.61d	0.188±0.01d	12 436±719e	10.16±1.44c	64.71±1.83c
10 : 90	182.97±1.27e	0.167±0.01d	18 769±983d	12.50±0.31b	74.50±2.56a
15 : 85	246.10±5.02b	0.274±0.01b	34 391±937c	16.42±1.68a	71.78±1.05b
20 : 80	230.63±5.89c	0.246±0.01c	48 670±434b	14.94±0.30b	65.98±0.67c
25 : 75	336.57±8.46a	0.328±0.03a	52 938±960a	19.51±1.78a	63.91±2.33c

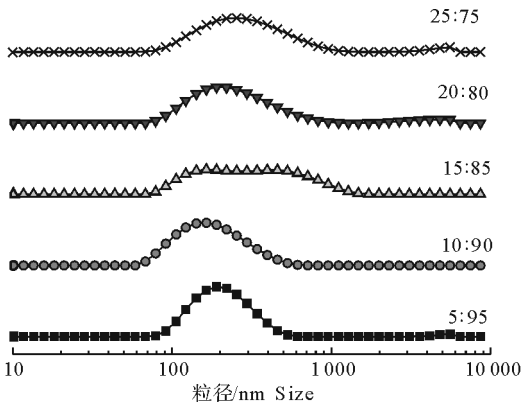


图 2 油水体积比对纳米乳液粒径分布的影响
Fig.2 Effect of oil-to-aqueous ratio on particle size distribution of nanoemulsion

2.2 阿拉伯胶与 ι -卡拉胶对双层纳米乳液物理特性的影响

验证试验结果表明,采用最佳工艺参数制备的柚皮苷单层纳米乳液(NA/WPI-e)的平均粒径在 145 nm 左右,PDI 在 0.18 左右,柚皮苷包埋率为

75.5%。为了进一步提高 NA/WPI-e 的稳定性,可添加与 WPI 所带电荷相反的多糖来制备双层纳米乳液。

如表 3 和表 4 所示,添加 ι -卡拉胶和阿拉伯胶(GA)后柚皮苷纳米乳液的粒径略有增加,这是 ι -卡拉胶和 GA 在静电力作用下吸附于蛋白质表面造成的。当 ι -卡拉胶和 GA 的质量浓度均为 0.3 g/100 mL 时,纳米乳液的粒径最高,可能是这 2 种阴离子多糖的加入在蛋白质界面表面形成了一层或多层致密膜。与单层纳米乳液相比,柚皮苷包埋率在双层纳米乳液中有所降低,当 ι -卡拉胶和 GA 在乳液中质量浓度均为 0.3 g/100 mL 时,柚皮苷包埋率最高,分别为 69.88% 和 64.78%。由表 5 可知,在 pH 6 条件下, ι -卡拉胶和 GA 的添加使纳米乳液的 Zeta 电位绝对值显著增加,由初始的 -14.40 mV 分别提高至 -45.70 mV 和 -47.60 mV,这是由于带负电的多糖增加了乳液的电负性,从而使纳米乳液的带电稳定性提高^[21]。

表 3 NA/WPI/ ι -carrageenan 型纳米乳液的相关物理指标

Table 3 Relevant physical indicators of NA/WPI/ ι -carrageenan nanoemulsions

ι -卡拉胶质量浓度/(g/100 mL) ι -Carrageenan concentration	平均粒径 D_{32} /nm Average size D_{32}	多分散系数 PDI	柚皮苷包埋率/% Naringin encapsulation ratio
0.0	148.30±1.36c	0.170±0.010c	75.50±2.56a
0.1	154.68±0.24c	0.197±0.004a	62.80±1.34d
0.2	163.30±0.16b	0.181±0.004b	64.17±1.19c
0.3	171.00±0.17a	0.197±0.005a	69.88±0.63d

注:所有样品均测定 3 次取平均值,同一列数据后标注不同字母代表样品间差异显著($P < 0.05$)。下表同。Note: All samples were measured 3 times and averaged, the same column of data was followed by different letters to represent significant differences among samples ($P < 0.05$). The same as below.

表 4 NA/WPI/GA 型纳米乳液的相关物理指标

Table 4 Relevant physical indicators of NA/WPI/GA nanoemulsions

GA 质量浓度/(g/100 mL) Gum arabic concentration	平均粒径 D_{32} /nm Average size D_{32}	多分散系数 PDI	柚皮苷包埋率/% Naringin encapsulation ratio
0.0	148.30±1.36b	0.170±0.010a	75.50±2.56a
0.1	161.43±1.46a	0.164±0.006ab	55.23±0.20c
0.2	162.77±2.96a	0.160±0.005b	56.78±0.31c
0.3	163.83±3.61a	0.140±0.010c	64.78±0.86b

表 5 NA/WPI/GA 与 NA/WPI/ ι -carrageenan 型纳米乳液在 pH 6 下的 Zeta 电位变化

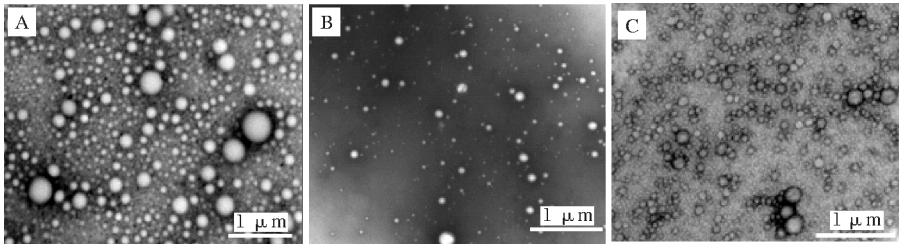
Table 5 The change of Zeta potential of NA/WPI/GA and NA/WPI/ ι -carrageenan nanoemulsions under pH 6

ι -卡拉胶质量浓度/(g/100 mL) ι -Carrageenan concentration	Zeta 电位/mV Zeta potential	阿拉伯胶质量浓度/(g/100 mL) Gum arabic concentration	Zeta 电位/mV Zeta potential
0.0	-14.40±1.46a	0.0	-14.40±1.46a
0.1	-30.30±1.77b	0.1	-42.50±1.37b
0.2	-38.23±0.45c	0.2	-43.80±1.28b
0.3	-45.70±0.45d	0.3	-47.60±1.32c

2.3 柚皮苷纳米乳液的显微观察

对 3 种乳液样品进行 TEM 观察,由图 3A 可知,NA/WPI-e 及其双层纳米乳液的液滴呈规则球形,但乳滴大小不均一,并伴随少量乳滴的轻微聚集现象。从图 3B、3C 可看出,双层乳液的液滴大小较

均一,NA/WPI/GA-e 比 NA/WPI-e 的液滴分散性更好;NA/WPI/ ι -carrageenan-e 液滴的分散性比 NA/WPI/GA-e 低,且存在少量液滴聚集融合现象。由图 3 也可以看出,纳米乳液的粒径绝大多数小于 0.2 μm ,与粒径分析仪测定的粒径分布及大小结果



A:NA/WPI-e; B:NA/WPI/GA-e; C:NA/WPI/ ι -carrageenan-e.

图 3 柚皮苷纳米乳液的透射电子显微镜图像

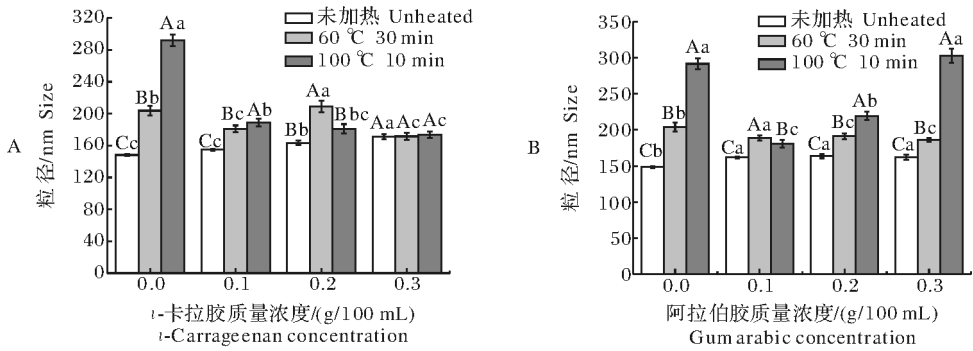
Fig.3 The TEM images of naringin nanoemulsion

基本一致。

2.4 柚皮苷纳米乳化体系的稳定性

1)柚皮苷纳米乳化体系在高温条件下的稳定性。将最佳工艺制备出的 NA/WPI-e 分别置于 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴条件下加热 30 min 和 100 $^{\circ}\text{C}$ 下加热 10 min,测定柚皮苷纳米乳液粒径的变化来衡量纳米乳化体系的高温稳定性,并测定 ι -卡拉胶与 GA 不同质量浓度对其的影响。由图 4 可知,高温水浴使 NA/WPI-e 粒径增加,100 $^{\circ}\text{C}$ 条件下加热 10 min 导致的粒径变化比 60 $^{\circ}\text{C}$ 条件下加热 30 min 导致的粒径变化显著。在高温处理的过程,乳化剂为 WPI 的乳化体系中油滴易发生聚集和交联,而本试验中乳液高温处理后无蛋白聚集现象,说明 NA/WPI-e 及

其双层纳米乳液均具有一定的高温耐受性。由图 4A 可知,在 100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min 的条件下,随着 ι -卡拉胶质量浓度对其的增加,双层纳米乳液的粒径显著降低($P < 0.05$)。当纳米乳液中的 ι -卡拉胶质量浓度为 0.3 g/100 mL 时,在 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min 和 100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min 后,双层纳米乳液的粒径基本不变,说明乳液的高温稳定性明显提高($P < 0.05$)。由图 4B 可知,在 100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min 的条件下,当 GA 质量浓度超过 0.1 g/100 mL 后,双层纳米乳液的粒径明显增大($P < 0.05$),说明乳液的高温稳定性逐渐降低。对比 NA/WPI-e 在高温下的粒径变化,当 GA 质量浓度为 0.1 g/100 mL 时,双层纳米乳液表现出良好的高温稳定性($P < 0.05$)。



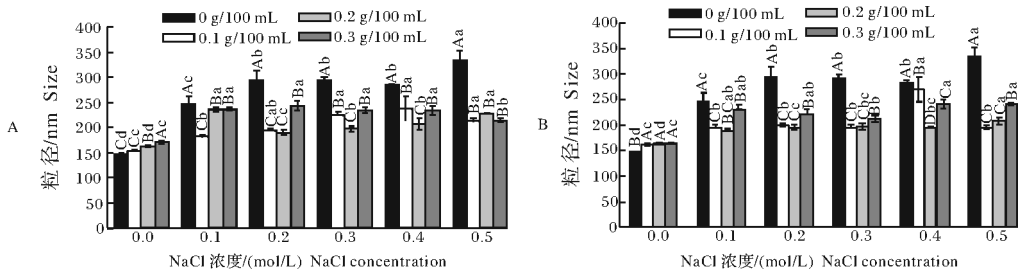
A: κ -卡拉胶 κ -Carrageenan; B: 阿拉伯胶 Gum arabic。小写字母不同表示相同乳液在不同温度下有显著性差异;大写字母不同表示在同一温度下不同乳液中有显著性差异 ($P < 0.05$)。The different lowercase indicates that the difference among the samples under the same emulsion and different temperature conditions is significant. The different capital indicates that the difference among the samples under the different emulsions and the same temperature conditions is significant ($P < 0.05$)。

图 4 温度对纳米乳化体系粒径的影响

Fig.4 Effect of temperature on droplet size of nanoemulsions

2) 柚皮苷纳米乳化体系在不同离子强度条件下的稳定性。将最佳工艺制备出的 NA/WPI-e 置于不同浓度 (0~0.5 mol/L) 的 NaCl 溶液中稀释, 测定乳液粒径的变化来考察 NA/WPI-e 在不同离子强度下的稳定性及 κ -卡拉胶和 GA 质量浓度对其的影响。由图 5 可知, 当 NaCl 浓度在 0~0.5 mol/L 时, 由于盐离子对分散相表面蛋白质电荷有中和作用, NA/WPI-e 的粒径随着盐离子浓度的增加而显著增加 ($P < 0.05$), 当 NaCl 浓度为 0.5 mol/L 时, 纳米乳液的液滴粒径为 333.7 nm。由图 5 可知, 当加入 κ -卡拉胶和 GA 后, 柚皮苷双层纳米乳化体系的

粒径在不同离子强度下均显著低于 NA/WPI-e ($P < 0.05$), 说明 κ -卡拉胶和 GA 均提高了柚皮苷纳米乳化体系的稳定性。由图 5A 可知, 当 κ -卡拉胶的质量浓度增加至 0.3 g/100 mL 时, 柚皮苷双层纳米乳液的粒径在不同离子强度下无显著差异 ($P > 0.05$), 且粒径均低于 NA/WPI-e。同样由图 5B 可见, GA 的质量浓度为 0.3 g/100 mL 的柚皮苷双层纳米乳液的粒径在不同离子强度下比较相近但是有一定的显著差异 ($P < 0.05$), 说明 GA 质量浓度为 0.3 g/100 mL 的柚皮苷双层纳米乳液抵抗盐离子不稳定因素能力较强。



A: κ -卡拉胶 κ -Carrageenan; B: 阿拉伯胶 Gum arabic。0 g/100 mL 曲线代表 NA/WPI 型纳米乳液, 0.1、0.2、0.3 g/100 mL 代表双层纳米乳中 κ -卡拉胶或者阿拉伯胶加入量。小写字母不同表示相同乳液在不同 NaCl 浓度下有显著性差异, 大写字母不同表示同一 NaCl 浓度在不同乳液中有显著性差异 ($P < 0.05$)。The 0 g/100 mL represents the NA/WPI type nanoemulsion, 0.1, 0.2 and 0.3 g/100 mL represent the amount of κ -carrageenan or gum arabic added in the bilayer nanoemulsion. The different lowercase indicates that the difference among the samples under the same emulsion but different NaCl concentrations conditions is significant. The different capital indicates that the difference among the samples under the different emulsions and the same NaCl concentration conditions is significant ($P < 0.05$)。

图 5 NaCl 浓度对纳米乳化体系粒径的影响

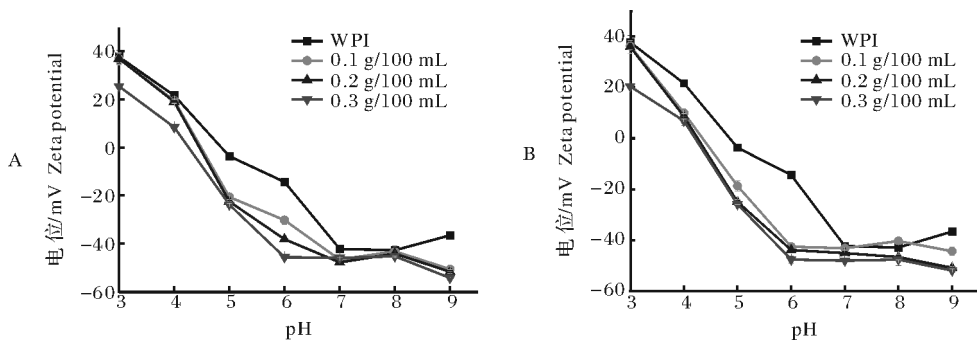
Fig.5 Effect of NaCl concentrations on the droplet size of nanoemulsions

3) 柚皮苷纳米乳化体系在不同 pH 下的稳定性。由于 WPI 在等电点处, 乳液的稳定性易受分散

相的影响而发生聚集, 可通过测定柚皮苷纳米乳化体系的 Zeta 电位值来考察柚皮苷纳米乳化体系的

稳定性。根据最佳工艺制备出 NA/WPI-e 后,测定纳米乳液在不同 pH 下的 Zeta 电位变化,得出纳米乳化体系在不同 pH 范围内的稳定性及 ι -卡拉胶与 GA 质量浓度对其的影响。由图 6 可知,在 pH 3~9 内,NA/WPI-e 的 Zeta 电位值随 pH 的上升而下降,且由 37.70 mV 降至 -42.80 mV。随着 pH 的上升,吸附在分散相表面的蛋白质分子所带的正电荷不断减少,负电荷不断增加,促使蛋白质分子的净电荷由正电逐渐变为负电。NA/WPI-e 的等电点在 4.5 左右。由图 6 可见,添加 ι -卡拉胶和 GA 后,柚皮苷纳米乳化体系在 pH 3~9 内,Zeta 电位值始终保持很强的电负性。同 NA/WPI-e 对比得出:纳米乳液的 Zeta 电位值降低,负电荷增加,且 Zeta 电位值的绝对值随着 ι -卡拉胶和阿拉伯胶浓度的增加

呈下降的趋势。当 ι -卡拉胶质量浓度为 0.3 g/100 mL 时,柚皮苷纳米乳液的 Zeta 电位值在 pH 3~9 内由 25.47 mV 降至 -53.40 mV;当 GA 质量浓度为 0.3 g/100 mL 时,柚皮苷纳米乳液的 Zeta 电位值则由 20.40 mV 降至 -51.90 mV。 ι -卡拉胶和 GA 均使 NA/WPI-e 的等电点左移,提高了 NA/WPI-e 在其等电点处的稳定性。NA/WPI-e 及双层纳米乳液的 Zeta 电位绝对值在 pH 6~9(中性和碱性)内均较高,表明纳米乳液稳定性良好。pH 6 条件下,单层纳米乳液所带负电荷 -14.40 mV,而 0.3 g/100 mL 的 ι -卡拉胶或 GA 的纳米乳液对应的 Zeta 电位值分别是 -45.70 mV 和 -47.60 mV,表明负电性的 ι -卡拉胶和 GA 的加入均提高了柚皮苷纳米乳液的电荷稳定性。



A: ι -卡拉胶 ι -Carrageenan; B:阿拉伯胶 Gum arabic.

图 6 pH 对纳米乳化体系 Zeta 电位值的影响

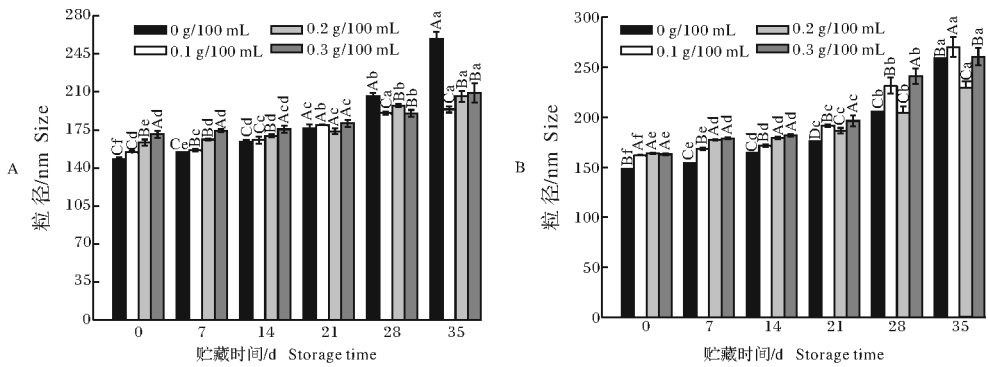
Fig.6 Effect of pH values on zeta potential of nanoemulsions

4)柚皮苷纳米乳化体系的贮藏稳定性。将最佳工艺制备好的 NA/WPI-e 置于 4 °C 温度下避光保存 35 d,通过粒径测量考察纳米乳化液的贮藏稳定性,并测定 ι -卡拉胶与 GA 浓度对柚皮苷纳米乳化体系贮藏稳定性的影响。由图 7 可见,NA/WPI-e 液滴的粒径随着贮藏时间的延长而显著增加 ($P < 0.05$),在贮藏 35 d 后,液滴粒径的增长幅度最大,达 74%。图 7A 显示,当双层纳米乳液中 ι -卡拉胶的质量浓度为 0.1 g/100 mL 时,乳液贮存 35 d 后,液滴粒径增加 25.4%。由于 ι -卡拉胶的增加,提高了分散相之间的静电斥力和空间阻力,从而使乳液的空间稳定性升高。当乳液中 ι -卡拉胶质量浓度达到 0.3 g/100 mL,乳液放置 35 d 后液滴粒径增加 22%。结果表明, ι -卡拉胶的添加有利于提高柚皮苷纳米乳液的稳定性。图 7B 显示,当 GA 质量浓度为 0.1 g/100 mL 时,纳米乳液的液滴粒径随着贮藏时间的延长呈现显著上升的趋势 ($P < 0.05$),贮

藏 35 d 后,乳液的液滴粒径增长 62%,显著高于 ι -卡拉胶制备的双层乳液。随着 GA 质量浓度的增加,乳液的粒径增长幅度降低,当乳液中 GA 质量浓度为 0.2 g/100 mL 时,乳液放置 35 d 后液滴粒径仅增加 34%,表明乳液的贮藏稳定性逐渐升高。

3 讨论

为提高柚皮苷在纳米乳液中的载量,本试验采用中链甘油三酯(MCT)为油相包载柚皮苷并制备纳米乳化体系,在刘小杰等^[22]的报告中指出,相比普通植物油,MCT 具有更好的热稳定性和抗氧化稳定性,且在正常的摄入量范围内,MCT 属于安全食品。相比于 Kanaze 等^[23]利用具有潜在毒性的化工合成聚合物,本试验采用了天然的可食用乳化剂 WPI,并采用可食用的绿色环保型运载材料,符合食品安全的要求;无需复杂的样品前处理过程,操作简便快速;制备的运载体系含有较高的柚皮苷包埋率。



A: ϵ -卡拉胶 ϵ -Carrageenan; B: 阿拉伯胶 Gum arabic. 0 g/100 mL 曲线代表 NA/WPI 型纳米乳液, 0.1、0.2、0.3 g/100 mL 代表双层纳米乳中 ϵ -卡拉胶或者阿拉伯胶加入量。小写字母不同表示相同乳液不同贮藏时间有显著性差异, 大写字母不同表示同一时间不同乳液有显著性差异 ($P < 0.05$)。The 0 g/100 mL represents the NA/WPI type nanoemulsion, 0.1, 0.2 and 0.3 g/100 mL represent the amount of ϵ -carrageenan or gum arabic added in the bilayer nanoemulsion. The different lowercase indicates that the difference among the samples under the same emulsion and different storage time conditions is significant. The different capital indicates that the difference among the samples under the different emulsion and the same time conditions is significant ($P < 0.05$).

图 7 贮藏时间对纳米乳化体系粒径的影响

Fig.7 Effect of storage time on the droplet size of nanoemulsions

因此,本试验制备的柚皮苷纳米乳液具有明显的优势。

在研究 WPI 质量浓度对柚皮苷纳米乳液稳定性的影响中发现,当 WPI 质量浓度高于 5.0 g/100 mL 时,总体系的理化稳定性降低,与 Jafari 等^[24]的研究结果相似, Jafari 利用排斥絮凝理论解释这一现象,当 WPI 浓度超过临界值时,连续相因渗透作用而引起液滴絮凝。

本试验研究双层纳米乳液在不同环境因素下的物理稳定性,并与 NA/WPI-e 对比后发现双层纳米乳液的物理稳定性更好。可能是由于在二次均质高能高压的条件下, WPI 与多糖在静电引力作用下, WPI 暴露出更多的正电基团与 GA 分子链中大量 $-\text{COO}^-$ 和 ϵ -卡拉胶中的 $-\text{SO}_4^-$ 等负电性基团中和^[25]。结果表明:在高温环境下, NA/WPI-e 本身就具有一定的高温稳定性,这是由于 WPI 中含有的 β -乳球蛋白对高温的耐受性较高^[26],对纳米乳液周围的致密蛋白层起到很好的保护效果,而双层纳米乳液较 NA/WPI-e 具有更好的高温耐受性。相比于单层乳液,加入 GA 和 ϵ -卡拉胶的双层乳液在不同离子强度下的稳定性和贮藏稳定性更强,这可能是由于 ϵ -卡拉胶分子可提高分散相间的静电斥力和空间阻力, GA 可增加体系质量传导的障碍^[27],从而增强纳米乳液的贮藏稳定性。 ϵ -卡拉胶和阿拉伯胶的引入提高了 NA/WPI-e 在其等电点处的稳定性,其原因可能是 ϵ -卡拉胶和阿拉伯胶的引入会

在分散相表面形成第二层界面层,从而增加了分散相表面的带电量和分散相之间的排斥力,但添加多糖制备双层乳液对中性 and 碱性条件下的稳定性无明显提升,后期仍需进一步研究。研究表明, WPI 与 ϵ -卡拉胶和 GA 结合制备的双层纳米乳液抵抗环境压力(温度、离子强度等)的能力方面更占优势,具有更好的物理稳定性,能对所包埋的柚皮苷提供更好的保护,与 Gharibzahedi 等^[28]利用果胶和 β -乳球蛋白制备的双层乳液的研究结果一致。由于 WPI 纳米乳液的液滴粒径较小,乳液均匀稳定,但受环境影响较大,而性质稳定的多糖乳液可以在高温、高离子强度条件和较宽 pH 值范围内保持贮藏稳定性^[29], WPI 与多糖结合制备的双层乳液可充分发挥这 2 种物质的优点^[30],在食品领域具有广阔的应用前景。

参 考 文 献

- [1] BADARY O A, ABDEL-MAKSOU D S, AHMED W A, et al. Naringenin attenuates cisplatin nephrotoxicity in rats[J]. Life sciences, 2005, 76(18): 2125-2135.
- [2] BEAR W L, TEEL R W. Effect of citrus flavonoids on the mutagenicity of heterocyclic amines and on cytochrome P4501A2 activity[J]. Anticancer research, 2000, 20(5b): 3609-3614.
- [3] MAHMOUD A M, ASHOUR M B, ABDEL-MONEIM A, et al. Hesperidin and naringin attenuate hyperglycemia-mediated oxidative stress and proinflammatory cytokine production in high fat fed/streptozotocin-induced type 2 diabetic rats[J].

- Journal of diabetes and its complications, 2012, 26(6): 483-490.
- [4] LYU J W, SUN X L, MA J X, et al. Involvement of periostin-sclerostin-Wnt/ β -catenin signaling pathway in the prevention of neurectomy-induced bone loss by naringin[J]. Biochemical and biophysical research communications, 2015, 468(4): 587-593.
- [5] MARILENA A R, JANET A, GUTIERREZ U, et al. *In vivo* anti-inflammatory effects of isorhamnetin glycosides isolated from *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill cladodes[J]. Industrial crops and products, 2015, 76: 803-808.
- [6] CHIGWECHOKHA P K, YOSHINAGAA A, NATSUKI K, et al. NEU3 inhibitory effect of naringin suppresses cancer cell growth by attenuation of EGFR signaling through GM3 ganglioside accumulation[J]. European journal of pharmacology, 2016, 782: 21-29.
- [7] 徐智儒, 肖峰, 蒋春红, 等. 犬血浆中柚皮苷和新橙皮苷的 LC-MS/MS 法测定及其药动学[J]. 中国医药工业杂志, 2016, 47(2): 192-197.
- [8] 许鹭, 蓝木香, 杨继国, 等. 柚皮苷-卵磷脂包合物的制备及其理化性质研究[J]. 现代食品科技, 2015, 31(8): 237-241.
- [9] FENG T, WANG K, LIU F F, et al. Structural characterization and bioavailability of ternary nanoparticles consisting of amylose, α -linoleic acid and β -lactoglobulin complexed with naringin[J]. International journal of biological macromolecules, 2017, 99: 365-374.
- [10] 陈剑兵, 郑美瑜, 陆胜民, 等. 柚皮苷的酶水解工艺[J]. 浙江农业科学, 2016, 57(9): 1492-1494.
- [11] 阎斐, 张辉. 可使用纳米乳的研究进展[J]. 中国食品学报, 2014, 14(1): 213-216.
- [12] FERNANDEZ-AVILA C, ESCRIBU R, TRUJILLO A J. Ultra-high pressure homogenization enhances physicochemical properties of soy protein isolate-stabilized emulsions[J]. Food research international, 2015, 75: 357-366.
- [13] DIMA S, DIMA C, IORDACHESCU G. Encapsulation of functional lipophilic food and drug biocomponents[J]. Food engineering reviews, 2015, 7(4): 417-438.
- [14] LIVNEY Y D. Milk proteins as vehicles for bioactives[J]. Current opinion in colloid and interface science, 2010, 15(1/2): 73-83.
- [15] TIPPETTS M, SHEN F K, MARTINI S. Oil globule microstructure of protein/polysaccharide or protein/protein bilayer emulsions at various pH[J]. Food hydrocolloid, 2013, 30(2): 559-566.
- [16] ZHANG P, LIU X, HU W J, et al. Preparation and evaluation of naringenin-loaded sulfobutylether- β -cyclodextrin/chitosan nanoparticles for ocular drug delivery[J]. Carbohydrate polymers, 2016, 149: 224-230.
- [17] 刘蕾, 袁芳, 高彦祥. α -乳白蛋白提高 β -胡萝卜素乳液稳定性[J]. 农业工程学报, 2016, 32(增刊 2): 423-429.
- [18] WANG B, LI D, WANG L J, et al. Ability of flaxseed and soybean protein concentrates to stabilize oil-in-water emulsions[J]. Journal of food engineering, 2010, 100: 417-426.
- [19] HE W, TAN Y, TIAN Z, et al. Food protein-stabilized nanoemulsions as potential delivery systems for poorly water-soluble drugs: preparation, *in vitro* characterization, and pharmacokinetics in rats[J]. International journal of nanomedicine, 2011, 6: 521-533.
- [20] EUSTON S R, FINNIGAN S R, HIRST R L. Aggregation kinetics of heated whey protein-stabilized emulsions[J]. Food hydrocolloid, 2000, 14: 155-161.
- [21] GUZEY D, MCCLEMENTS D J. Formation, stability and properties of multilayer emulsions for application in the food industry[J]. Advances in colloid and interface science, 2006, 128/129/130: 227-248.
- [22] 刘小杰, 何国庆, 陶飞, 等. 中链甘油三酯及其在食品工业中的应用[J]. 食品科学, 2005, 26(8): 469-472.
- [23] KANAZE F I, KOKKALOU E, NIOPAS I, et al. Thermal analysis study of flavonoid solid dispersions having enhanced solubility[J]. Journal of thermal analysis and calorimetry, 2006, 83(2): 283-290.
- [24] JAFARI S M, HE Y H, BHANDARI B. Nano-emulsion production by sonication and microfluidization: a comparison[J]. International journal of food properties, 2006, 9: 475-485.
- [25] TIPPETTS M, MARTINI S. Influence of iota-carrageenan, pectin, and gelatin on the physicochemical properties and stability of milk protein-stabilized emulsions[J]. Journal of food science, 2012, 77(2): C253-C260.
- [26] DEMETRIADES K, MCCLEMENTS D J. Influence of pH and heating on physicochemical properties of whey protein-stabilized emulsions containing a nonionic surfactant[J]. Journal of agricultural and food chemistry, 1998, 46(10): 3936-3942.
- [27] NIU F G, DONG Y T, SHEN F, et al. Phase separation behavior and structural analysis of ovalbumin-gum arabic complex coacervation[J]. Food hydrocolloid, 2014, 43: 1-7.
- [28] GHARIBZAHEDI S M T, ROSTAMI H, YOUSEFI S. Impact of whey protein-beet pectin conjugation on the physicochemical stability of β -carotene emulsions[J]. Food hydrocolloids, 2012, 28(2): 258-266.
- [29] LIM A S L, ROOS Y H. Stability of flocculated particles in concentrated and high hydrophilic solid layer-by-layer (LBL) emulsions formed using whey proteins and gum arabic[J]. Food research international, 2015, 74: 160-167.
- [30] BENGOCHEA C, JONES O G, GUERRERO A, et al. Formation and characterization of lactoferrin/pectin electrostatic complexes: impact of composition, pH and thermal treatment[J]. Food hydrocolloids, 2011, 25(5): 1227-1232.

Preparation and stability of naringin nanoemulsion system

CHENG Zhe PAN Siyi

*College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University/
Key Laboratory of Environmental Food Science, Huazhong Agricultural University,
Wuhan 430070, China*

Abstract The aim was to construct a safe and efficient naringin nutrient delivery system. Whey protein isolate (WPI) was used as emulsifier, the preparation conditions were studied for naringin mono-layer nanoemulsion (NA/WPI-e) and bilayer nanoemulsion with ι -carrageenan and gum arabic. Subsequently, the stability of the NA/WPI-e and naringin bilayer nanoemulsion was investigated under different environmental factors. The results showed that the optimal preparation conditions of NA/WPI-e were: 5 g/100 mL WPI concentration, 10% oil-to-aqueous ratio (V/V), 68.95 MPa homogenization pressure for 3 cycles. The naringin encapsulation ratio could reach 75.50% under this condition. For the bilayers nanoemulsion with 0.3 g/100 mL of gum arabic and ι -carrageenan, naringin encapsulation ratios were the highest, which were 69.80% and 64.78%, respectively. The naringin bilayer nanoemulsion's droplets were significantly smaller than NA/WPI-e at 100 °C water bath for 10 min and different NaCl concentrations ($P < 0.05$). After 35 days of storage, the growth rate of bilayer nanoemulsion's droplets was significantly lower than that of NA/WPI-e ($P < 0.05$). And the storage stability increased with increasing concentration of ι -carrageenan and gum arabic. Bilayer nanoemulsion with ι -carrageenan owned higher ionic stability and storage stability than that with gum arabic. The naringin bilayer nanoemulsion improved the stability of NA/WPI-e at its isoelectric point. In conclusion, the bilayer nanoemulsion prepared by adding gum arabic and ι -carrageenan had better physical stability, so it can provide better protection for naringin.

Keywords naringin; nanoemulsion; whey protein isolate; ι -carrageenan; gum arabic; stability

(责任编辑:赵琳琳)