

## 负载陈皮提取物的 $W_1/O/W_2$ 型乳液的制备及其性能评价

王庭雨, 沈飞, 赵佳伟, 吴振强

### Preparation of $W_1/O/W_2$ Emulsion Loaded with Chenpi Extract and Its Properties Evaluation

WANG Tingyu, SHEN Fei, ZHAO Jiawei, and WU Zhenqiang

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2024050380>

## 您可能感兴趣的其他文章

### Articles you may be interested in

基于三种多糖与酪蛋白复配制备W/O/W型乳液及其包封红景天苷效果的研究

Study on the Preparation of W/O/W Emulsion Based on Three Polysaccharides Mixed with Casein and Its Encapsulation Effect of Salidroside

食品工业科技. 2022, 43(19): 137-145 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022020247>

植物乳杆菌W1荚膜多糖结构、免疫及抗衰老活性的研究

Structure, Immune and Anti-aging Activities of Capsular Polysaccharide Produced by *Lactobacillus plantarum* W1

食品工业科技. 2025, 46(4): 90-99 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2024030207>

安梨果渣可溶性膳食纤维微波辅助酶法提取工艺优化及结构表征

Optimization and Characterization of Microwave-assisted Enzymatic Extraction of Soluble Dietary Fiber from Anli Fruit Pomace

食品工业科技. 2022, 43(7): 191-198 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021070192>

超声波-微波协同提取沙棘果皮渣中可溶性膳食纤维工艺优化

Optimization of Ultrasonic-Microwave Synergistic Extraction of Soluble Dietary Fiber from Seabuckthorn Peel Residue

食品工业科技. 2020, 41(11): 200-206,220 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.11.031>

人参提取物胁迫培养对副干酪乳杆菌JLUs66菌株生长特性及耐受性的影响

Effect of Ginseng Extract Stress Culture with *Lactobacillus paracasei* JLUs66 on Strain Growth Characteristics and Tolerances

食品工业科技. 2022, 43(11): 144-150 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021090253>

高粱乌米可溶性膳食纤维提取工艺优化及功能性分析

Extraction Process Optimization and Functional Analysis of Soluble Dietary Fiber from *Sporisorium reilianum*

食品工业科技. 2023, 44(5): 213-221 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022060236>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

王庭雨, 沈飞, 赵佳伟, 等. 负载陈皮提取物的  $W_1/O/W_2$  型乳液的制备及其性能评价 [J]. 食品工业科技, 2025, 46(9): 124–135.  
doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024050380

WANG Tingyu, SHEN Fei, ZHAO Jiawei, et al. Preparation of  $W_1/O/W_2$  Emulsion Loaded with Chenpi Extract and Its Properties Evaluation[J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(9): 124–135. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024050380

· 研究与探讨 ·

# 负载陈皮提取物的 $W_1/O/W_2$ 型乳液的 制备及其性能评价

王庭雨<sup>1,2</sup>, 沈 飞<sup>1,2</sup>, 赵佳伟<sup>1,3</sup>, 吴振强<sup>1,\*</sup>

(1. 华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510006;

2. 江门市泛亚生物工程与健康研究院, 广东江门 529000;

3. 益为益生物制造(江门)有限公司, 广东江门 529000)

**摘 要:** 为提高陈皮提取物 (Chenpi extract, CPE) 中的活性成分的封装稳定性及生物可及性, 本研究以柑渣可溶性膳食纤维-明胶 (Citrus soluble dietary fiber-gelatin, CSDF-G) 复合物和聚蓖麻酸甘油酯作为乳化剂制备了负载 CPE 的  $W_1/O/W_2$  双重乳液, 并探究了 CSDF-G 复合物和  $W_1/O/W_2$  双重乳液最佳制备条件、乳液环境耐受性以及体外消化特性。结果显示 CSDF 和 G 通过非共价静电作用相互结合, 并且在 pH3.5 条件下结合效果最佳, 形成的复合物乳化能力最强。当 CSDF/G 比例为 3:1 (w/w)、CSDF-G 复合物总浓度为 2% (w/v)、 $W_1/O$  和  $W_2$  比例为 3:7 (v/v) 时, 制备的  $W_1/O/W_2$  双重乳液分布均匀, 粒径最小, 粘弹性最强, 多酚和黄酮的封装率分别达到 96.82% 和 90.08%。此外, 该条件下制备的乳液不仅在 pH3.0~5.0 和离子强度 0~100 mmol/L 的环境下保持了较好的稳定性, 同时还对高温和紫外光照环境展现出较强的耐受能力。体外模拟消化结果表明, 乳液的双重结构在胃肠道消化过程中被缓慢破坏。经肠道消化后, 乳液负载的 CPE 的多酚生物可及性较游离大豆油负载的 CPE 提高了 33.22%。上述结果表明本研究制备的  $W_1/O/W_2$  双重乳液具有良好的活性成分递送潜力, 研究结果为新型陈皮相关功能产品的开发提供了参考。

**关键词:** 陈皮提取物, 柑渣可溶性膳食纤维-明胶复合物,  $W_1/O/W_2$  双重乳液, 环境耐受性, 生物可及性

中图分类号: TS209

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2025)09-0124-12

本文网刊:

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2024050380



## Preparation of $W_1/O/W_2$ Emulsion Loaded with Chenpi Extract and Its Properties Evaluation

WANG Tingyu<sup>1,2</sup>, SHEN Fei<sup>1,2</sup>, ZHAO Jiawei<sup>1,3</sup>, WU Zhenqiang<sup>1,\*</sup>

(1. School of Biology and Biological Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China;

2. Pan Asia (Jiangmen) Institute of Biological Engineering and Health Industry Co., Ltd., Jiangmen 529000, China;

3. Yiwu Biofabrication (Jiangmen) Co., Ltd., Jiangmen 529000, China)

**Abstract:** To improve the encapsulation stability and bioaccessibility of active components in Chenpi extract (CPE), the citrus soluble dietary fiber-gelatin (CSDF-G) and polyglycerol polyricinoleate were used as emulsifiers to form a  $W_1/O/W_2$  double emulsion loaded with CPE. The study also investigated the optimal parameters for producing the CSDF-G complex and the  $W_1/O/W_2$  double emulsion, as well as their environmental stability and *in vitro* digestive properties. Results

收稿日期: 2024-05-29

基金项目: 广东省科技专项资金 (大专项+任务清单) (2020JK18203210); 广东省江门市科技创新平台建设资金项目 (2021JK02402003)。

作者简介: 王庭雨 (1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 药学, E-mail: [tingyu\\_wang718@163.com](mailto:tingyu_wang718@163.com)。

\* 通信作者: 吴振强 (1963-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 发酵工程、生物工程、绿色生物制造以及天然活性成分生物转化理论与应用, E-mail:

[btzhqwu@scut.edu.cn](mailto:btzhqwu@scut.edu.cn)。

revealed that CSDF and gelatin interacted via non-covalent electrostatic forces, with the strongest combination effect at pH3.5, as the emulsification capability of complex was strongest. When the CSDF/G ratio was 3:1 (w/w), the total concentration of CSDF-G complex was 2% (w/v), and the  $W_1/O$  and  $W_2$  ratios were 3:7 (v/v), the prepared  $W_1/O/W_2$  double emulsion had a uniform distribution, the smallest particle size, the strongest viscoelasticity, and the encapsulation rates to polyphenol and flavonoid reached 96.82% and 90.08%, respectively. Furthermore, the emulsion  $W_1/O/W_2$  generated with these parameters remained stable in pH3.0~5.0 settings with ionic strength 0~100 mmol/L and showed strong resistance to high temperatures and UV light. The dual structure of emulsions was gradually dissolved during gastrointestinal digestion, as shown by *in vitro* digestion. After intestinal digestion, the bioaccessibility of polyphenols in  $W_1/O/W_2$  emulsion-loaded CPE was increased by 33.22% compared with that in free soybean oil-loaded CPE. In conclusion, the  $W_1/O/W_2$  double emulsion prepared in this study has good potential for active ingredient delivery, and the results will provide a reference for the development of new functional Chenpi-related products.

**Key words:** Chenpi extract; citrus soluble dietary fiber-gelatin complex;  $W_1/O/W_2$  double emulsion; environmental tolerance; bioaccessibility

陈皮是我国历史悠久的传统中药,也是首批药食同源的珍贵原料之一<sup>[1]</sup>。陈皮药理功效丰富,因此常作为功能食品添加剂添加到食品配方中。然而,陈皮提取物(Chenpi extract, CPE)中的多酚、黄酮等主要活性成分稳定性较差,易受到环境因素(包括 pH、温度、光、氧等)的影响而发生降解<sup>[2]</sup>。此外,多数活性成分通常在胃部酸性环境条件下稳定,但在中性肠道环境中分解或转化,导致其生物利用度较低,这些缺点极大地限制了陈皮提取物在功能食品领域中的应用<sup>[3]</sup>。

目前已有一些研究利用胶体递送系统对多酚、黄酮类物质进行封装,从而提高其保质期稳定性和生物利用度,然而这些递送系统往往存在储存稳定性差、活性成分生物利用度低的问题<sup>[4]</sup>。近年来,以食品生物大分子聚合物(如蛋白质和多糖等)稳定的 Pickering 乳液因安全性高、生物相容性好等优势而在食品领域备受瞩目<sup>[5]</sup>。双重 Pickering 乳液是通过在核心相上再提供两层保护层而形成的复杂分散体系,其可有效保护功能成分活性并延缓其释放,目前已被证明是一种高效的活性成分封装手段。例如,在  $W_1/O/W_2$  双重乳液体系中,较小的水相液滴分散在油相( $W_1/O$ )中,然后进一步分散在外部水相( $W_2$ )中<sup>[6]</sup>。通过静电相互作用形成的蛋白质-多糖复合物作为潜在的乳化剂也已用于制备稳定的  $W_1/O/W_2$  乳液<sup>[7]</sup>。Liang 等<sup>[8]</sup>利用乳清蛋白-果胶复合物作为  $W_1/O/W_2$  乳液的外部水性乳化剂,提高了乳液的稳定性及其负载的益生菌在储存、巴氏杀菌和体外消化过程的存活率。Li 等<sup>[9]</sup>利用乳清蛋白分离物分别与低甲氧基果胶和  $\kappa$ -卡拉胶形成复合物制备稳定的  $W_1/O/W_2$  乳液以递送脂溶性维生素  $V_E$  和水溶性维生素  $V_{B2}$ ,延缓了其在模拟胃肠道条件下的释放。可溶性膳食纤维因具有出色的溶解度和持水性/持油性而常被食品行业加工成功能性食品成分<sup>[10]</sup>。柑橘渣中富含丰富的柑橘可溶性膳食纤维(Citrus soluble dietary fiber, CSDF),其含量达到 20.0%~30.6%<sup>[7]</sup>。前期研究发现,CSDF 具有优异的乳化和凝胶形成能力,是理想的功能食品加工材料<sup>[11]</sup>。明胶(Gelatin,

G)是动物胶原蛋白水解产物,是一种重要的天然两亲性大分子。明胶在较宽的 pH 范围内带正电荷,在一定条件下能够与带负电荷的多糖发生静电相互作用,形成静电络合物<sup>[7]</sup>。目前尚无文献报道利用 CSDF-G 非共价复合物制备稳定的  $W_1/O/W_2$  乳液并对陈皮提取物进行封装。

因此,本研究针对陈皮提取物中活性成分封装不稳定、生物利用度低的问题,开发了一种通过 CSDF 和 G 非共价相互作用形成的新型复合物乳化剂,用于稳定负载陈皮提取物的  $W_1/O/W_2$  乳液。此外,本研究还对 CPE 负载乳液的制备条件进行了优化,并对乳液的环境耐受性和体外消化过程中多酚的生物可及性进行了评估,本研究旨在为 CPE 相关功能产品的开发及陈皮活性成分胶体递送体系的构建提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

5 年份陈皮、柑橘(渣) 中国广东省江门市新会区; 52°白酒 广东省九江酒厂有限公司; 耐高温  $\alpha$ -淀粉酶(40 U/mg)、淀粉葡萄糖苷酶(100000 U/mL)、聚甘油蓖麻醇酸酯(Polyglyceryl-6 polycricinoleate, PGPR)、十二烷基硫酸钠(Sodium dodecyl sulfate, SDS) 分析纯,上海麦克林生化科技有限公司; 中性蛋白酶(3000 U/mg)、明胶(B 型,胶强度~250 g Bloom)、大豆油 分析纯,上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 盐酸、氢氧化钠、无水乙醇 分析纯,天津市致远化学试剂有限公司; 尼罗河红、尼罗河蓝 分析纯,上海伊卡生物公司; 没食子酸、橙皮苷 色谱纯,上海源叶生物科技有限公司; 所用水均为蒸馏水。

RE 100-Pro 旋转蒸发仪、MS7-H550-Pro 磁力搅拌器、D-160 手持均质机 大龙兴创实验仪器(北京)股份公司; 5804R 型高速冷冻离心机 Eppendorf 公司; Litesizer 500 纳米粒度及 Zeta 电位分析、MCR 702e 旋转流变仪 安东帕(上海)商贸有限公司; 多功能酶标仪 美国 Molecular Devices 公司;



HH-S 型数显恒温水浴锅 巩义市予华仪器有限公司; PB-10 pH 计 德国赛多利斯有限公司; LA-960 激光粒度仪 Horiba 公司; SCIENTZ-10N 冷冻干燥机 宁波新芝生物科技股份有限公司; XPH-300Z 光学显微镜 上海长方光学仪器公司; LSM710 共聚焦激光扫描显微镜 德国 Zeiss 公司; 302 nm, 15 W 紫外灯管 深圳市冠宏雅光电科技有限公司。

## 1.2 实验方法

1.2.1 陈皮提取物的制备 陈皮经洗涤干燥后粉碎, 过 40 目筛网。参照 Li 等<sup>[12]</sup>的方法制备陈皮提取液, 并进行修改。将陈皮粉与酒精度为 52° 的白酒按 1:10(w/v) 的比例混合, 于 600 W、50 °C 的条件下超声提取 45 min。随后, 将混合物用 Whatman 4 号滤纸过滤, 收集滤液, 即为陈皮提取液。将滤液在 -80 °C 下预冻 12 h, 再冷冻干燥 48 h, 研磨成粉, 即为陈皮提取物。

1.2.2 柑渣可溶性膳食纤维的提取 根据 GB 5009.88-2014 的方法提取柑渣可溶性膳食纤维, 并稍作修改<sup>[13]</sup>。将柑橘果肉渣干燥粉碎后, 过 100 目筛网, 得到柑橘渣粉。将柑橘渣粉与蒸馏水按 1:20 (w/v) 的比例混合, 调节 pH 至 7.0, 再加入耐高温  $\alpha$ -淀粉酶(使混合物中淀粉酶浓度为 500 U/g), 在 95 °C 下反应 35 min; 待混合物冷却至 50 °C, 调节 pH 至 4.5, 并加入淀粉葡萄糖苷酶(使混合物中淀粉葡萄糖苷酶的浓度为 500 U/g), 在 50 °C 下反应 45 min; 随后, 将混合物 pH 调至 7.0, 加入 0.2%(w/v) 中性蛋白酶, 在 50 °C 下反应 45 min。反应结束后, 将混合物煮沸 5 min, 使酶失活, 然后在 25 °C、4000 r/min 速度下离心混合物并收集上清液。将上清液旋蒸浓缩后加入 4 倍体积的无水乙醇, 在 4 °C 条件下沉淀 8 h, 收集沉淀物, 将其冷冻干燥 48 h, 得到柑渣可溶性膳食纤维。

1.2.3 柑渣可溶性膳食纤维-明胶复合物的制备及其特性分析

1.2.3.1 柑渣可溶性膳食纤维-明胶复合物的制备 将 CSDF 和 G 按质量比 3:1、2:1、1:1、1:2 和 1:3 的比例混合并加入适量蒸馏水溶解, 制备总复合物浓度 1% 的分散液。随后, 将分散液于 45 °C、600 r/min 的条件下磁力搅拌 2 h 以充分溶解, 然后调节 pH 至 3.5, 得到 CSDF-G(1%, w/v) 复合物。以 G 和 CSDF 作为对照。

1.2.3.2 柑渣可溶性膳食纤维-明胶复合物的特性分析 采用浊度和 Zeta 电位表征 CSDF 和 G 的结合特性。

浊度的测定: 参考 Carpentier 等<sup>[14]</sup>描述的方法并做适当修改。将 1%(w/v) 的 CSDF、G 以及不同比例的 CSDF-G 复合物溶液稀释至浓度为 0.2% (w/v), 随后用 0.01 mol/L 的 HCl 溶液调节各体系的 pH 至 5.0~6.0, 再用 0.25 mol/L 的 HCl 溶液调节

各体系的 pH 至 4.0~5.0, 然后用 0.5 mol/L 的 HCl 溶液调节各体系的 pH 至 3.0~4.0, 最后用 1 mol/L 的 HCl 溶液调节混合物 pH 至 2.0~3.0, 实时监测 pH 变化过程中溶液在 500 nm 处的吸光度, 即为溶液的浊度。

Zeta 电位测定: 将 1%(w/v) 的 CSDF、G 以及不同比例的 CSDF-G 复合物溶液稀释至浓度为 0.1% (w/v), 然后用 1 mol/L 的 HCl 溶液调节其 pH 至 2.0~5.0, 使用 Zeta 电位仪测定不同 pH 条件下各体系溶液的 Zeta 电位值。

采用乳化活性和乳化稳定性表征 CSDF-G 复合物的乳化能力特性。乳化活性和乳化稳定性的测定: 参考 Zhang 等<sup>[15]</sup>描述的方法, 并略做修改。取适量 1%(w/v) 的 CSDF、G 以及不同比例的 CSDF-G 复合物溶液, 用 1 mol/L HCl 和 1 mol/L NaOH 调节其 pH 至 3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5 和 5.7(初始混合 pH); 随后, 将待测溶液浓度稀释至 5 mg/mL 后, 取 3 mL 溶液与 1 mL 大豆油混合, 使用均质机在 16000 r/min 转速下均质 6 min, 得到待测乳液; 将待测乳液静置 10 min, 分别在第 0 min 和第 10 min 时, 从底部吸取 80  $\mu$ L 乳液加入到 3.92 mL 0.1%(w/v) 的 SDS 溶液中, 充分混匀后于 500 nm 下测定吸光值  $A_{500\text{ nm}}$ ; 以 0.1%(w/v) SDS 溶液调零。乳化活性指数(Emulsifying activity index, EAI)和乳化稳定性指数(Emulsifying stability index, ESI)由如下公式计算得到:

$$\text{EAI}(\text{m}^2/\text{g}) = \frac{2 \times (2.303 \times A_0) \times N \times 10^{-4}}{\varphi \times L \times C} \quad \text{式 (1)}$$

$$\text{ESI}(\text{min}) = \frac{A_0 \times \Delta T}{A_0 - A_{10}} \quad \text{式 (2)}$$

式中,  $A_0$  表示静置 0 min 时的吸光值,  $N$  表示乳液稀释倍数(50),  $\varphi$  表示油相的体积分数(0.25),  $L$  表示比色皿的光径(1 cm),  $C$  表示样品浓度(5 mg/mL),  $A_{10}$  表示静置 10 min 时的吸光值,  $\Delta T$  表示时间间隔(10 min)。

1.2.4  $W_1/O/W_2$  双重乳液的制备及其特征分析

1.2.4.1  $W_1/O/W_2$  双重乳液的制备 采用两步乳化制备  $W_1/O/W_2$  乳液。将 CPE 粉末分散在蒸馏水中, 使其浓度为 25 mg/mL, 得到陈皮提取物内水相( $W_1$ ); 将  $W_1$  与含有 5%(v/v) PGPR 的大豆油按体积比 2:8 的比例混合, 23000 r/min 下高速剪切 3 min, 制得  $W_1/O$  初乳; 取一定量的 CSDF-G 复合物溶于水中, 45 °C 磁力搅拌 30 min 至充分溶解, 调节其 pH 至 3.5, 作为外水相( $W_2$ )。将制备好的  $W_1/O$  初乳与  $W_2$  按一定的体积比混匀, 在 23000 r/min 下高速均质 3 min, 制得  $W_1/O/W_2$  双重乳液。

1.2.4.2  $W_1/O/W_2$  双重乳液制备条件优化 对于总复合物浓度的探究, 固定内层  $W_1/O$  乳液和外层  $W_2$  水相比比例为 2:8, CSDF-G 的比例为 3:1, 设置总

复合物浓度为 0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%(w/v), 以乳液宏观、微观图像、共聚焦激光扫描显微镜 (Confocal laser scanning microscope, CLSM) 图像和流变学特性作为评价指标; 对于 CSDF-G 比例的探究, 固定总复合物浓度为 2% (w/v), 内层  $W_1/O$  乳液和外层  $W_2$  水相比比例为 2:8, 设置 CSDF:G 比例为 3:1、2:1、1:1、1:2 和 1:3 (w/w), 以乳液 Zeta 电位和粒径作为评价指标; 对于内层  $W_1/O$  乳液和外层  $W_2$  水相比比例的探究, 固定总复合物浓度为 2%(w/v), CSDF-G 的比例为 3:1, 设置内层  $W_1/O$  乳液和外层  $W_2$  水相比比例为 2:8、3:7、4:6、5:5、6:4(v/v), 以总多酚和总黄酮包封率作为评价指标。

1.2.4.3 不同条件下制备的  $W_1/O/W_2$  双重乳液的表征  $W_1/O/W_2$  乳液形态学测定: 将不同 CSDF-G 总复合物浓度条件下制备的  $W_1/O/W_2$  新鲜乳液在 25 °C 下静置贮存 3 d, 观察其第 0 d 和第 3 d 的宏观形态变化; 取 3  $\mu$ L 乳液至载玻片上, 使用光学显微镜在 40 倍物镜下观察新鲜乳液的微观形态; 此外, 将尼罗河蓝(0.1%, w/w, 水溶液)和尼罗河红(0.1%, w/w, 异丙醇溶液)按 1:1(v/v)比例混合制备混合染料, 随后将 50  $\mu$ L 混合染料加入到 500  $\mu$ L 乳液样品中, 并在 25 °C 下避光保持 30 min, 取 3  $\mu$ L 染色样品置于载玻片上, 使用 CLSM 进一步观察不同 CSDF-G 总复合物浓度条件下制备的  $W_1/O/W_2$  新鲜乳液液滴特征。其中尼罗河蓝用于染色蛋白质, 其激发波长设置为 633 nm, 尼罗河红用于染色油相, 其激发波长设置为 488 nm。

乳液流变性能测定: 使用配有 CP50-1 探头(直径 50 mm, 间隙 1 mm)的旋转流变仪, 在 1% 的恒定应变幅值下于线性粘弹性区域内进行动态频率扫描测试, 收集不同条件下制备的  $W_1/O/W_2$  乳液在 0.1~10 Hz 频率范围内的储能模量( $G'$ )和损耗模量( $G''$ )的频率变化曲线; 在 0.1~100  $s^{-1}$  的范围内测定粘度变化。

Zeta 电位的测定: 将不同 CSDF:G 比例条件下制备的新鲜乳液样品稀释, 使其浓度为 0.1%(w/v), 使用 Zeta 电位仪测定电位。

乳液粒径的测定: 将不同 CSDF:G 比例条件下制备的新鲜乳液样品用去离子水稀释 10 倍, 使用激光粒度仪测定其粒径。大豆油和水的折射率分别设定为 1.474 和 1.333。所有测定均在 25 °C 下进行。每个样品平行测定 3 次。

总多酚、总黄酮包封率的测定: 取 500  $\mu$ L 不同内层  $W_1/O$  乳液和外层  $W_2$  水相比比例条件下制备的乳液样品, 用去离子水稀释 5 倍, 轻轻振荡后取少量上清液过 0.22  $\mu$ m 滤膜, 测定上清液中总多酚/总黄酮的浓度  $A_0$ , 即为未被乳液封装的 CPE 浓度; 随后, 将稀释后的乳液在 600 W 条件下超声破乳 30 min, 再于 12000 r/min 下离心 15 min, 测定离心后上清液

总多酚/总黄酮的浓度  $A_1$ , 即为未被乳液封装和被乳液封装的总 CPE 浓度; 用于制备  $W_1/O/W_2$  的陈皮提取物中总多酚/总黄酮的浓度为  $A_2$ 。其中, 总多酚含量 (Total polyphenols content, TPC) 通过 Folin-Ciocalteu 试剂测定, 以毫克没食子酸当量/克干重 (mg GAE/g) 表示<sup>[16]</sup>; 总黄酮含量 (Total flavonoids content, TFC) 采用 Shen 等<sup>[17]</sup> 的方法测定, 以毫克橙皮苷当量/克干重 (mg HE/g) 表示。乳液中总黄酮/总多酚的封装效率 (Encapsulation efficiency, EE) 通过公式(3)计算:

$$EE(\%) = \frac{A_1 - A_0}{A_2} \times 100 \quad \text{式 (3)}$$

乳液中总多酚的保留率 (Retention efficiency, RE) 由公式(4)计算:

$$RE(\%) = \frac{C_1}{C_0} \times 100 \quad \text{式 (4)}$$

式中,  $C_1$  为一定时间间隔后测定的乳液中的 TPC,  $C_0$  为新制备的乳液中的 TPC。

1.2.5 最佳条件下制备的  $W_1/O/W_2$  乳液的性能评价

1.2.5.1 环境耐受性评估 pH 及离子强度耐受性: 将最佳条件下制备的  $W_1/O/W_2$  乳液用去离子水稀释 5 倍, 用 0.5 mol/L HCl 和 0.5 mol/L NaOH 调节乳液 pH 为 2、3、4、5、6、7 和 8, 或用 NaCl 调节体系离子强度为 0、50、100、200、300、400、500 mmol/L, 测定不同 pH 及离子强度条件下的乳液的粒径、多分散指数 (Polydispersity index, PDI) 以及 Zeta 电位。其中, PDI 通过激光粒度仪测定。

温度和紫外光照耐受性: 对于温度耐受性, 将最佳条件下制备的  $W_1/O/W_2$  乳液分别置于 50、70 和 90 °C 的水浴锅中, 于 0、0.5、1、2、3 和 4 h 取样测定样品中总多酚的保留率; 对于紫外光照耐受性, 将最佳条件下制备的  $W_1/O/W_2$  乳液和等浓度的 CPE 水溶液暴露在距离紫外灯管 10 cm 处, 照射 48 h, 分别于 0、2、4、6、8、20、24、30、36 和 48 h 取样测定乳液和 CPE 水溶液的总多酚的保留率。

1.2.5.2 体外消化特性评估 体外消化稳定性测定: 将 2 mL 最佳条件下制备的乳液用离子水稀释至 10 mL, 然后与胃模拟液 (Simulated gastric fluid, SGF; 含胃蛋白酶 2000 U/mL, pH3.0) 按体积比 1:1 混合均匀, 调节 pH 至 2.0, 于 37 °C 的恒温水浴磁力搅拌器中、150 r/min 条件下模拟胃消化 2 h。消化结束后, 用 0.25 mol/L NaOH 迅速调节混合体系的 pH 至 7.0, 使胃蛋白酶失活, 随后将胃消化物与模拟肠液 (Simulated intestinal fluid, SIF; 含 100 U/mL 胰酶、10 mmol/L 胆汁盐和 0.01 mmol/L  $CaCl_2$ ) 按 1:3(v/v) 混匀, 并用 0.25 mol/L NaOH 调节 pH 至 7.0, 于 37 °C、450 r/min 条件下模拟肠消化 2 h。期间不断用 0.25 mol/L NaOH 调节混合体系的 pH, 使其维持在 7.0。

游离脂肪酸(Free fatty acid, FFA)释放率测定:在模拟肠消化过程中,于不同消化时间点取样,用0.25 mol/L NaOH 标准溶液中和样品中的 FFA,并记录消耗的 NaOH 标准溶液体积,计算从乳液中释放的 FFA 含量。FFA 的释放率通过式(5)计算:

$$\text{FFA释放率}(\%) = \frac{V_{\text{NaOH}} \times C_{\text{NaOH}} \times M_{\text{Lipid}}}{W_{\text{Lipid}} \times 2} \times 100 \quad \text{式(5)}$$

式中,  $V_{\text{NaOH}}$  是消耗的 NaOH 溶液的体积(L),  $C_{\text{NaOH}}$  是 NaOH 溶液的摩尔浓度(mol/L),  $M_{\text{Lipid}}$  是所用大豆油的平均分子量(g/mol, 238),  $W_{\text{Lipid}}$  是乳液所含的大豆油的质量(g)。

生物可及性测定:将肠消化后的混合物在 4 ℃、18000 r/min 条件下离心 30 min, 离心后的混合物分为三层, 其中上层为未消化的油脂, 中间层为含有 CPE 的胶束层, 下层为难以消化或未消化的固形物。将胶束层用 0.45 μm 水系滤膜过滤后测定其 TPC, 生物可及性(Bioaccessibility, BA)通过式(6)计算:

$$\text{BA}(\%) = \frac{C_s}{C_0} \times 100 \quad \text{式(6)}$$

式中,  $C_s$  是胶束层中 TPC,  $C_0$  是乳液中初始的 TPC。

### 1.3 数据处理

所有实验均进行三次重复, 实验数据以三次实验数据的均数±标准差(SD)值表示; 采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析; 采用单因素方差分析(ANOVA)和 Duncan 多极差异检验确定样本间差异的显著性, 显著性水平为 0.05。

## 2 结果与分析

### 2.1 可溶性膳食纤维-明胶复合物的特性

2.1.1 复合物的结合特性 浊度和 Zeta 电位可以反映颗粒的聚集行为和静电相互作用<sup>[8]</sup>。由图 1A 可见, 单一 G 溶液和单一 CSDF 溶液浊度在测试 pH 范围(pH2.0~6.0)内基本不变, 而不同 CSDF-G 配比体系的浊度均随着 pH 增加呈现先上升后下降的趋势。这是因为 G 电离的正电荷会随着 pH 的降低而逐渐增加, 而多糖的负电荷会由于羧基电离的抑制而逐渐减少<sup>[18]</sup>。此外, 不同 CSDF-G 配比体系的最大浊度值随 CSDF/G 比例的降低而呈现出先增加后稳定的趋势, 此时对应的 pH 逐渐增大。Souza 等<sup>[19]</sup>发现蛋白质浓度较高的比例有利于卵清蛋白/卡拉胶复合物的形成, 当卵清蛋白和卡拉胶的比例为 10:1 时其形成的复合物浊度值最高, 表明该过程是由于静电相互作用的强度增加而发生的。此外, 在 pH3.5 处的 CSDF 和 G 非共价相互作用较强。

Zeta 电位达到零的 pH 通常被认为是等电点(pI)。如图 1B 所示, 在 pH2.0~5.0 的范围内, G 的等电点约为 4.6, 而 CSDF 溶液的 Zeta 电位均为负值, 表明其羧基部分的 pKa 较低。蛋白质和多糖之间复合凝聚物的形成通常发生在蛋白质的 pI 和多糖反应

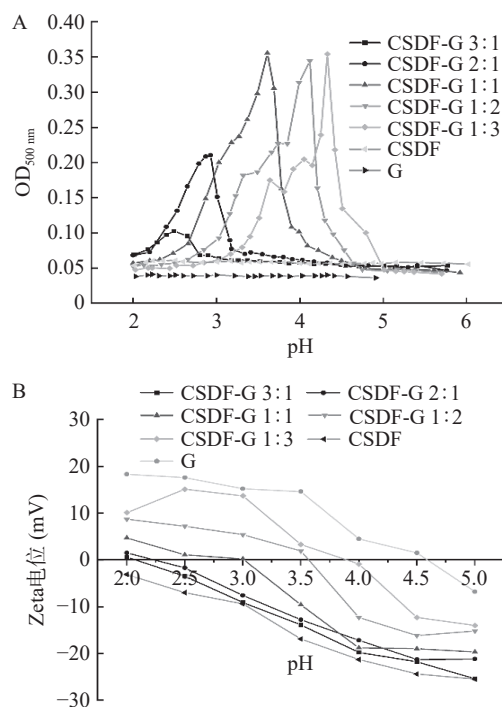


图1 CSDF、G 以及不同混合比例 CSDF-G 复合物在不同 pH 下的浊度(A)和 Zeta 电位(B)

Fig.1 Turbidity (A) and Zeta potential (B) of CSDF, G, and CSDF-G complexes with different mixing ratios at different pH

基团的 pKa 之间。CSDF 的 pKa<2.0, 表明 CSDF 和 G 能够在广泛的 pH(2.0~4.6)范围内相容。不同混合比条件下 CSDF-G 的电荷密度在 pH2.15~3.88 之间为零。在此 pH 范围内, G 和 CSDF 之间的静电吸引力较高, 可能导致非共价复合物的形成。此外, CSDF-G 复合物的 Zeta 电位随着 pH 和 CSDF/G 比值的降低而升高, 表明其稳定性逐渐增强。CSDF/G 为 3:1~1:1 的复合物的带电性质与 CSDF 更接近, 表明多糖在复合物的整体电学性质中占主导地位<sup>[20]</sup>。随着 G 的比例增加, 净电荷为 0 的点逐渐右移, 这与浊度曲线中最大浊度值右移的现象相符。从 Zeta 电位曲线图上还可以看出, pH 在 3.5 时, CSDF 和 G 的电位差值最大, 表明此 pH 条件下最有利于 CSDF 和 G 非共价复合物的形成。

2.1.2 复合物的乳化能力特性 EAI 表示蛋白质或复合物促进乳液形成的能力, 而 ESI 是蛋白质或复合物防止乳液油水分离、脂肪漂浮和絮凝, 从而维持乳液稳定性的能力的量度<sup>[21]</sup>。由图 2A 可见, CSDF-G 复合物在 pH3.5~4.0 范围内的 EAI 明显高于 CSDF 和 G, 可能是由于在此范围内形成 CSDF-G 复合物时, G 的蛋白质结构发生重排并暴露出疏水性基团, 导致其与油水界面的粘附增加<sup>[22]</sup>。由图 2B 可知, 当 CSDF 和 G 质量比为 3:1 和 2:1 时, 在 pH3.0~4.0 范围内其形成的复合物的 ESI 显著高于其他组 ( $P<0.05$ )。研究显示,  $W_1/O/W_2$  双重 Pickering 乳液的稳定性和乳化性能通常取决于固体颗粒<sup>[23]</sup>。在单一蛋白质稳定的 Pickering 乳液系统中, 疏水作用和



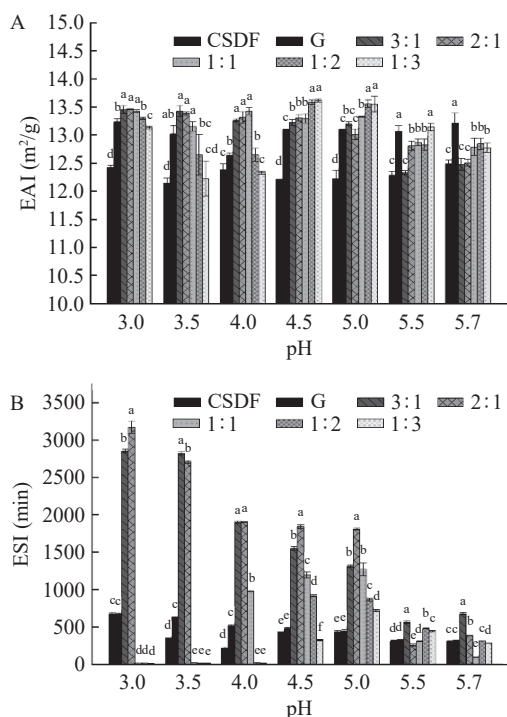


图 2 CSDF、G 以及不同混合比例 CSDF-G 复合物在不同 pH 下的 EAI(A)和 ESI(B)

Fig.2 EAI (A) and ESI (B) of CSDF, G, and CSDF-G complexes with different mixing ratios at different pH

注: 不同字母表示差异显著,  $P < 0.05$ , 图 6~图 9、图 11 同。

范德华力是主要作用力, 导致乳液容易絮凝, EAI 和 ESI 较低<sup>[24]</sup>。天然多糖虽然有一定的表面活性, 但多数以亲水性为主, 维持油水界面平衡的能力较弱, 通常不能单独用作 Pickering 乳液乳化剂<sup>[25]</sup>。然而, 在酸性条件下, 多糖可以通过和蛋白质结合, 以改善其絮凝和聚集状态, 进而增强其吸附和稳定油水界面的能力<sup>[8]</sup>。此外, 多糖比例的增加会导致静电排斥和空间位阻效应增强, 乳液体系黏度增加, 体系内颗粒运动减慢, 从而提高了  $W_1/O/W_2$  双重 Pickering 乳液稳定性<sup>[26]</sup>。同时, 随着 pH 逐渐远离 G 的 pI(4.6), CSDF 和 G 的静电相互作用逐渐增强, 这也会导致

复合物在 pH3.0~3.5 的范围内乳化性能的提高。图中还可发现, 随着 G 比例的增加(1:2、1:3), 复合物的 ESI 明显降低, 这可能是由于 G 与 CSDF 的过度结合, CSDF 和 G 表面的电荷趋于相等, 这种电荷的中和会减少油滴之间的静电排斥, 导致表面疏水性的显著降低和蛋白质构象柔韧性的部分减弱, 这一现象与 Wang 等<sup>[27]</sup> 报告的结果相似。综合浊度、Zeta 电位和乳化能力测定的结果, 选定 pH3.5 用于 CSDF-G 非共价复合物的制备。

## 2.2 不同条件下 $W_1/O/W_2$ 乳液的理化特性

### 2.2.1 不同总复合物浓度制备 $W_1/O/W_2$ 乳液的特性

#### 2.2.1.1 $W_1/O/W_2$ 乳液的宏观和光学显微形态

图 3A 展示了乳液贮存 3 d 前后宏观形态的变化。当 CSDF-G 复合物浓度大于 1.0% 时, 其制备的乳液贮存 3 d 后仍保持均一、稳定。由显微图像(图 3B)可见, 各组乳液样品的液滴完整, 均呈规则的圆球状, 且在显微镜下形成双重液滴复合的形态, 证实了  $W_1/O/W_2$  乳液的形成。当复合物浓度在 1.5%~2.0% 时, 乳液液滴粒径较小, 大小均一, 分布均匀。这可能是由于较高浓度的 CSDF-G(3:1)复合物中多糖的存在提高了外层水相的黏度, 从而通过增加空间位阻而阻止了内层乳液的泄露及乳液的聚集<sup>[28]</sup>。当 CSDF-G 复合物浓度进一步增加时(2.5%、3.0%), 乳液的液滴大小增大, 并且乳液液滴之间的聚集程度也相应增大。可能是由于过高的多糖浓度导致桥接絮凝并削弱复合物的乳化能力, 从而导致液滴之间融合和聚集<sup>[8]</sup>。

#### 2.2.1.2 $W_1/O/W_2$ 乳液的激光共聚焦显微形态

CLSM 通常用于观察乳液微观结构和油水界面处颗粒的吸附。不同总 CSDF-G 复合物浓度条件下制备的乳液的染色结果如图 4 所示。可以看出, 红色的 CSDF-G 复合物将绿色的内相油滴包裹, 证实了  $W_1/O/W_2$  乳液的形成。当总复合物浓度低于 1.0% 时, 乳液液滴趋于聚集, 且液滴大小不均匀, 这种现象

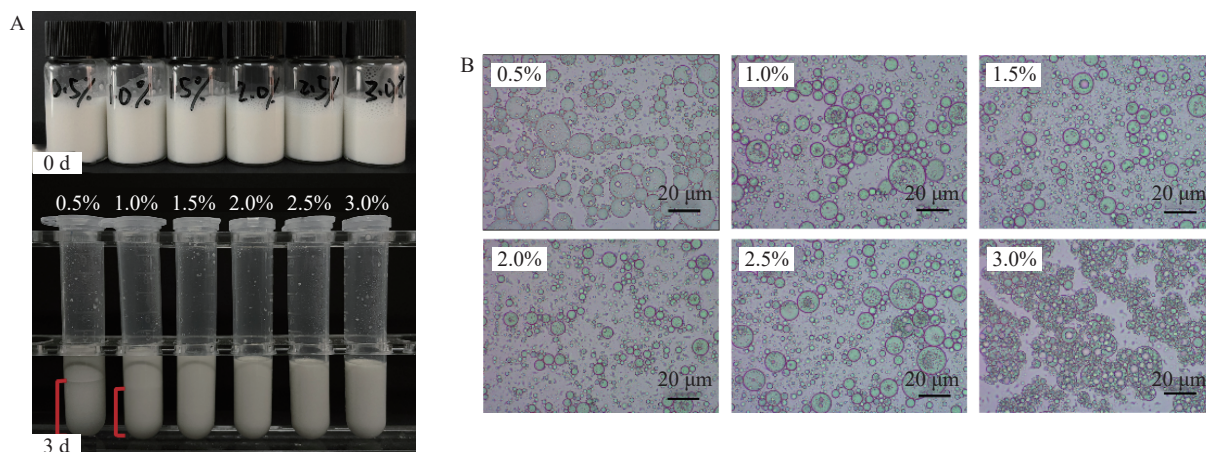


图 3 不同总 CSDF-G 复合物浓度(0.5%~3.0%)制备的  $W_1/O/W_2$  乳液储存 0、3 d 的外观(A)和 0 d 的显微镜图(B)

Fig.3 Appearance at 0 and 3 d (A) and microscopic images at 0 d (B) of  $W_1/O/W_2$  emulsions prepared with different total CSDF-G complex concentrations

可能归因于油水界面处的静电排斥力不足以抵消液滴聚集,从而导致液滴聚结<sup>[29]</sup>。随着 CSDF-G 复合物的浓度增加至 2.0%,乳液粒径明显减小,且分布更加趋向于均匀,可能是由于该浓度的复合物颗粒能够提供足够的空间排斥力,从而维持了乳液的稳定。Liu 等<sup>[30]</sup>的研究结果表明,1.5%~2.5% 浓度的豌豆分离蛋白/辛烯基琥珀酸酐-玉米淀粉在油水界面处呈均匀分布,进而形成了可靠的界面层,有效地稳定了 Pickering 乳液。当复合物浓度进一步增加至 3% 时,乳液呈现明显的凝胶状。Zhuang 等<sup>[31]</sup>也发现过高的魔芋葡甘聚糖浓度会使乳液凝胶的质地变硬,导致乳液液滴难以在剪切作用下分散而呈现凝胶态聚集。

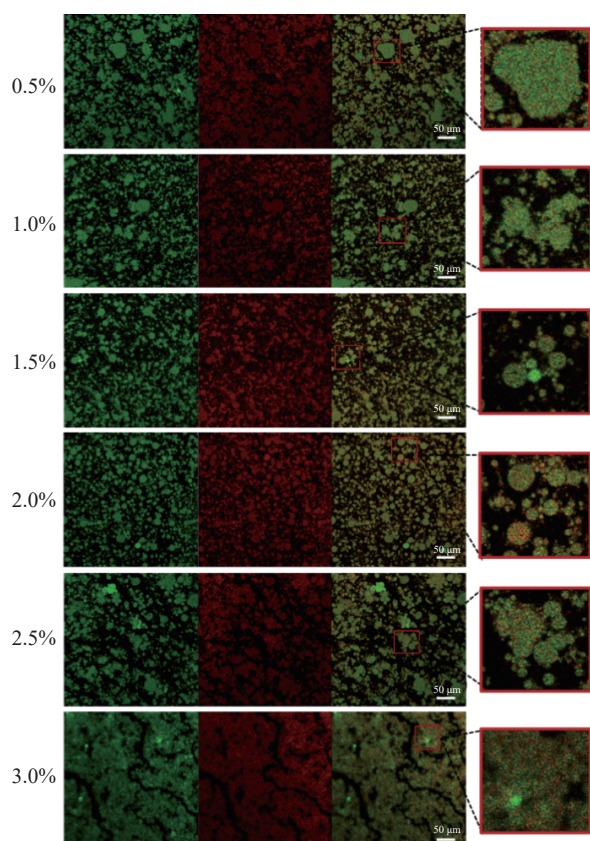


图4 不同总 CSDF-G 复合物浓度制备  $W_1/O/W_2$  乳液的 CLSM 图像

Fig.4 CLSM image of  $W_1/O/W_2$  emulsion prepared with different CSDF-G total complex concentrations

注:比例尺为 50  $\mu\text{m}$ ;每种乳液采集了三张图像:左列绿色为油相,中间列红色为 CSDF-G 复合物,右列为油和 CSDF-G 复合物染色叠加图。

**2.2.1.3  $W_1/O/W_2$  乳液的流变学性质** 乳液的流变特性是影响其稳定性和功能的最重要因素之一。不同总 CSDF-G 复合物浓度(0.5%、1%、2%、3%)条件下制备的乳液的稳态剪切表观粘度值与剪切速率的函数关系如图 5A 所示。所有乳液均表现出“剪切稀化”行为,表观粘度随剪切速率增加而降低,表明所有样品在非牛顿流体中表现为假塑性流体。CSDF-G 复合物以浓度依赖性方式增加了  $W_1/O/W_2$

乳液的表观粘度,表明高浓度的 CSDF-G 复合物形成了更强的结构网络。这种现象可能是因为增加乳化剂颗粒的浓度会使乳液液滴更接近,从而使其以更致密的方式堆积,乳液液滴的这种密集分布导致更高的粘度,并使它们更耐变形<sup>[32-33]</sup>。动态振荡测量用于表征乳液的粘弹性,由图 5B 可见,总 CSDF-G 复合物浓度对  $W_1/O/W_2$  乳液的流变性能影响较大,复合物浓度越高的乳液  $G'$  和  $G''$  值越高。在低浓度(小于 1.0%)时,乳液粘弹性模量之间表现出交叉点,表明乳液从低频弹性向高频粘性转变。并且,随着复合物浓度的增加,交叉点逐渐右移,这可能是由于高浓度导致的体系粘弹性增大。当复合物浓度高于 1.0% 时,乳液  $G' > G''$ ,  $G'$  和  $G''$  之间没有交叉,这可以被认为弹性行为,表明形成了具有弱凝胶特性的凝胶状网络结构,这种现象可归因于乳液液滴在高频率下的结构重排,且液滴浓度越高,乳液频率稳定性越强<sup>[34-36]</sup>。

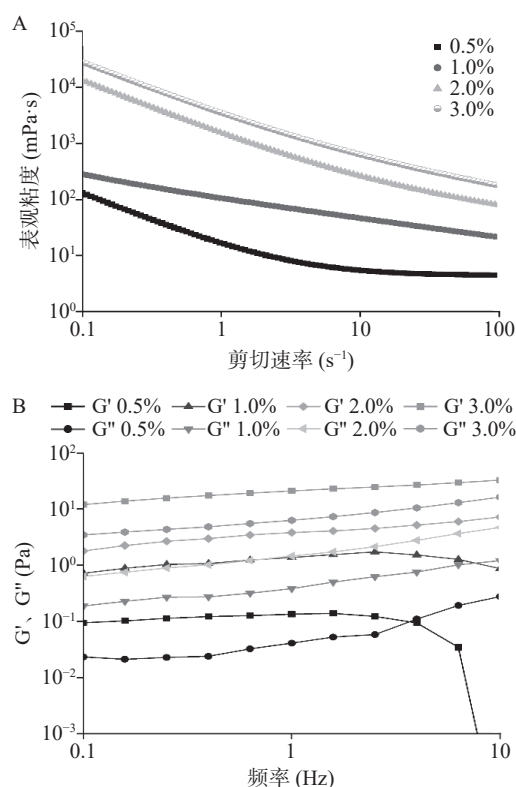


图5 不同总 CSDF-G 复合物浓度制备的  $W_1/O/W_2$  乳液的流变学特性

Fig.5 Rheological properties of  $W_1/O/W_2$  emulsions prepared with different total CSDF-G complex concentrations  
注:(A)表观粘度与剪切速率的关系;(B)振荡频率扫描曲线。

综合不同总复合物浓度条件下制备的  $W_1/O/W_2$  乳液的形态以及流变学特性,确定 2.0% 为最佳总复合物浓度。

**2.2.2 不同 CSDF/G 比例制备  $W_1/O/W_2$  乳液的特性** CSDF、G 以及不同 CSDF-G 比例复合物的乳液的 Zeta 电位分布如图 6A 所示。当 CSDF/G 比例为 3:1~1:1 时,乳液的 Zeta 电位均  $< -25$  mV,



稳定性良好,这可能是因为复合物中高比例的 CSDF 提供了较高的负表面电荷,形成了较强的粒子间静电排斥力,阻止了液滴的聚集<sup>[32]</sup>。然而,当 CSDF-G 复合物中 G 的比例继续增加,乳液的 Zeta 电位的绝对值逐渐降低。这可能是由于一方面 G 表面的正电荷与 CSDF 表面的负电荷的电荷中和程度增加,另外一方面高 G 比例的 CSDF-G 复合物的粒径较大,维持  $W_1/O/W_2$  乳液稳定性的能力较差,从而导致乳液的稳定性降低。

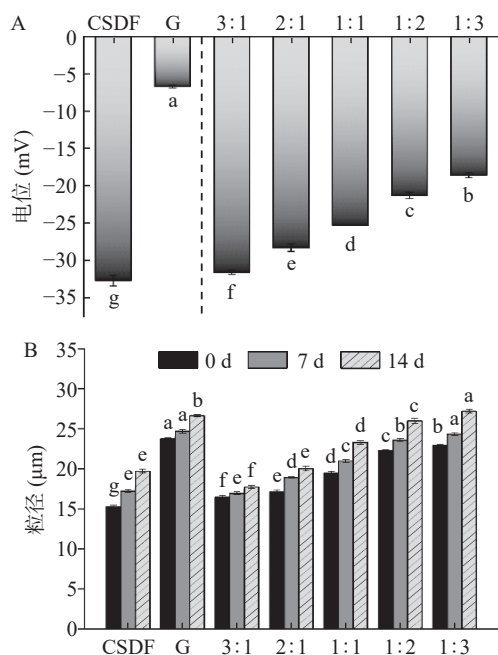


图 6 CSDF、G 以及不同比例的 CSDF-G 复合物制备的  $W_1/O/W_2$  乳液的 Zeta 电位(A)和储存 0、7、14 d 后的液滴尺寸(B)

Fig.6 Zeta potential (A) and droplet sizes after storage for 0, 7 and 14 d (B) of  $W_1/O/W_2$  emulsions prepared by CSDF, G and different ratios of CSDF-G complexes

图 6B 显示了由 CSDF、G 及不同 CSDF/G 比例复合物稳定的乳液样品在 25 °C 条件下储存 0、7 和 14 d 后的平均液滴尺寸。仅由 G 制备的  $W_1/O/W_2$  新鲜乳液液滴尺寸最大,达到 23.74  $\mu\text{m}$ ,而由 CSDF-G 复合物制备的乳液液滴尺寸明显降低。当 CSDF/G 的比例为 3:1 时,乳液液滴尺寸最小(16.48  $\mu\text{m}$ ),随着复合物中 G 比例的增加,乳液液滴逐渐变大,表明乳液稳定性降低。储存 7 d 后,仅由 CSDF 或仅由 G 制备的乳液粒径分别增加了 12.5% 和 3.88%;储存 14 d 后,粒径分别增加了 28.75% 和 12.18%。而由 CSDF/G 的比例为 3:1 形成的复合物制备的乳液储存 7 d 和 14 d 后的粒径变化最小,分别增加了 2.82% 和 7.53%。以上结果说明以 CSDF-G 复合物作为  $W_1/O/W_2$  乳液的外层乳化剂能够有效改善单一蛋白质或单一多糖稳定的乳液的储存稳定性,并且 CSDF/G 比例为 3:1 时形成的复合物稳定乳液的能力最佳。因此将 CSDF/G 比例设置为 3:1 进行进一步的探究。

2.2.3 不同内层  $W_1/O$  乳液和外层  $W_2$  水相比比例制备  $W_1/O/W_2$  乳液的特性 乳液包封率是影响生物活性成分功能特性的关键因素。图 7 显示了不同  $W_1/O$  和  $W_2$  比例下制备的  $W_1/O/W_2$  乳液的总多酚和总黄酮的包封率。与内层  $W_1/O$  乳液相比,双重乳液显著提高了对 CPE 的包封效果。当  $W_1/O:W_2$  为 3:7 时,其制备的双重乳液包封率最高(总多酚: 96.82%, 总黄酮: 90.08%)。这可能是由于外层水相中较高比例的 CSDF-G 提供了致密凝胶网络,增加了包封的稳定性。有研究报道 *Cajanus cajan* 叶多酚纳米颗粒的多酚包封率为 87.61%,茶多酚纳米颗粒的多酚包封率为 86.96%<sup>[37-38]</sup>,均低于本研究结果。进一步增大  $W_1/O:W_2$  比例,乳液包封率逐渐下降,当比例增加至 6:4 时,总多酚和总黄酮的包封率分别降低至 83.01% 和 61.25%。这可能是由于外层界面层厚度降低导致内层水相的向外迁移,内层水相中所封装的活性成分也随之迁移到乳液表面而导致表面多酚、黄酮含量增加,内层有效封装量降低,总的包封率下降。这与 Bertrand 等<sup>[39]</sup>在明胶-果胶复合凝聚系统中观察到高肉桂醛包封率的发现一致。综上, $W_1/O/W_2$  乳液优化后的最佳条件为:CSDF/G 比例为 3:1(w/w)、CSDF-G 复合物总浓度为 2%(w/v)、 $W_1/O$  和  $W_2$  比例为 3:7(v/v)。

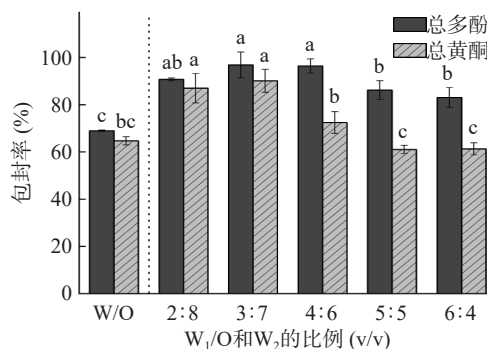


图 7 内层  $W/O$  乳液及不同内相/外相比比例下  $W_1/O/W_2$  乳液对 CPE 中总多酚和总黄酮的包封率

Fig.7 Encapsulation efficiency of total polyphenols and total flavonoids in CPE by inner  $W/O$  emulsion and  $W_1/O/W_2$  emulsion at different inner/outer phase ratios

## 2.3 最佳条件制备 $W_1/O/W_2$ 乳液的性能

### 2.3.1 $W_1/O/W_2$ 乳液环境耐受性

2.3.1.1 pH 及离子强度耐受性 pH 对  $W_1/O/W_2$  乳液液滴尺寸、PDI 和 Zeta 电位的影响如图 8 所示。当 pH 为 3.0~5.0 时,新鲜制备的双重乳液的液滴大小为 16.4~16.71  $\mu\text{m}$ ,PDI 为 0.32~0.37,Zeta 电位为 -28.06~-33.41 mV,表明  $W_1/O/W_2$  乳液在此 pH 范围内具有优异的稳定性。这些结果归因于乳液外层 CSDF-G 复合物粒子之间的强静电相互作用。随着 pH 的增加,乳液的液滴尺寸和 PDI 逐渐变大,Zeta 电位的绝对值逐渐降低,表明乳液在较高 pH 条件下稳定性降低。

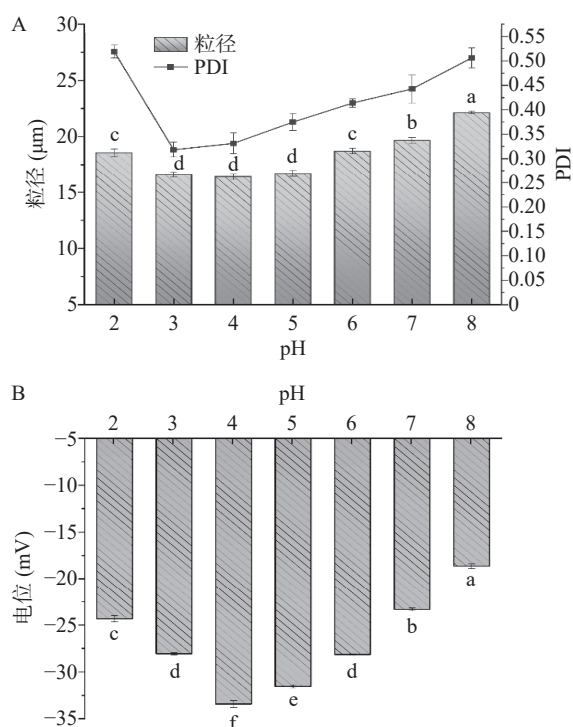


图8  $W_1/O/W_2$  乳液在 pH2~8 下的液滴尺寸和 PDI(A) 及 Zeta 电位(B)

Fig.8 Droplet size and PDI (A) and Zeta potentials (B) of  $W_1/O/W_2$  emulsions at pH2~8

图9显示了离子强度对乳液稳定性能的影响。当离子强度为 0~100 mmol/L 时,乳液液滴尺寸随离子强度的增加而缓慢增加(16.37~18.36  $\mu\text{m}$ ),且 Zeta 电位值均小于 -30 mV,表明  $W_1/O/W_2$  乳液能

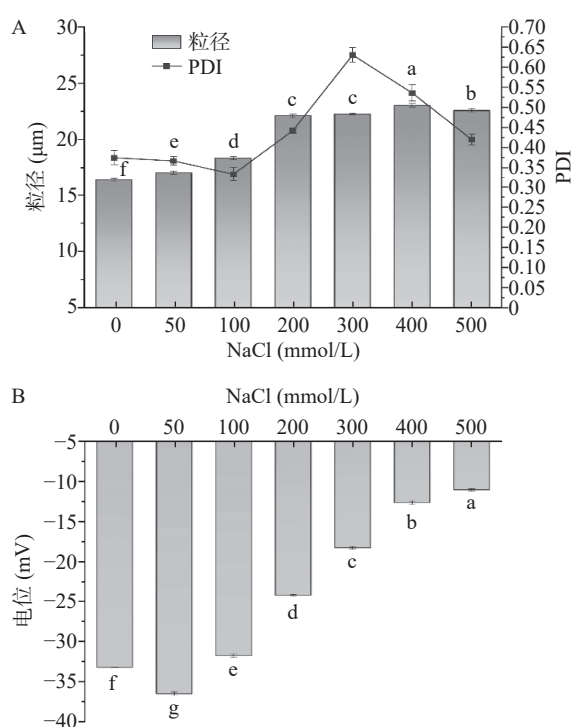


图9  $W_1/O/W_2$  乳液在不同离子强下的液滴尺寸和 PDI(A) 及 Zeta 电位(B)

Fig.9 Droplet size and PDI (A) and Zeta potentials (B) of  $W_1/O/W_2$  emulsions at different ionic strengths

够在较低离子强度下维持相对稳定。这可能是因为在外水相中添加低浓度的 NaCl 有利于平衡内水相与外水相之间的渗透压,避免因水分之间的迁移而导致的粒径变化<sup>[40]</sup>。当离子强度  $\geq 200$  mmol/L 时,乳液液滴尺寸显著增加( $P < 0.05$ ),达到 22.12~23.03  $\mu\text{m}$ ,此时 Zeta 电位值也由 -24.25 mV 提高至 -11.04 mV,这意味着当 NaCl 的浓度超过 100 mmol/L 时,乳液体系稳定性下降。这可能是由于过量的  $\text{Na}^+$  降低了蛋白与多糖分子间的静电吸引力,导致一些蛋白质从复合物中释放,从而改变了系统的带电性能,在此条件下  $W_1/O/W_2$  乳液最外层界面层上的蛋白质吸附和重排性能下降,液滴相互絮凝<sup>[41]</sup>。此外,非极性基团之间疏水相互作用的强度以及内外水相之间的渗透平衡也可能因盐浓度的增加而改变<sup>[42]</sup>,导致系统的稳定性下降。

2.3.1.2 温度和紫外光照耐受性 多酚、黄酮极易因暴露于高温和紫外光照下而降解。因此,测试了  $W_1/O/W_2$  乳液对不同温度和紫外光照的耐受能力。如图 10A 所示,双重乳液中总多酚保留率随着温度的升高而降低。50  $^{\circ}\text{C}$  的热处理过程中,总多酚的保留率在 0~4 h 内均高于 80%,这表明双重乳液在相对较低温度下表现出优异多酚保护能力。这是由于外层 CSDF-G 复合物能够形成较强的凝胶网络,为内层功能成分提供有效保护。经 70  $^{\circ}\text{C}$  和 90  $^{\circ}\text{C}$  热处理 4 h 后,乳液的总多酚的保留率分别高于 65%、

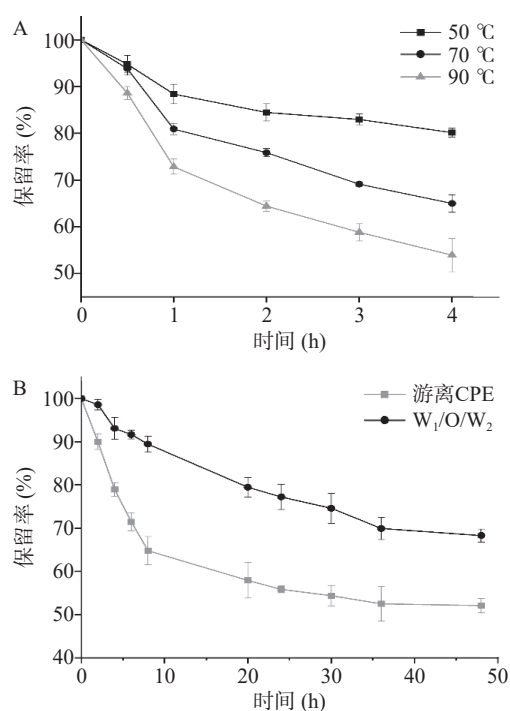


图10  $W_1/O/W_2$  乳液中的总多酚在不同温度下的保留率(A) 及游离 CPE 和  $W_1/O/W_2$  乳液中的总多酚在紫外照射下的保留率(B)

Fig.10 Retention rate of total polyphenols in  $W_1/O/W_2$  emulsion at different temperatures (A) and retention rate of total polyphenols in free CPE and  $W_1/O/W_2$  emulsions under ultraviolet irradiation (B)

55%, 保护能力下降。温度升高加快了 Pickering 乳液界面层的迁移率, 从而导致内层负载物被释放降解。在壳聚糖颗粒稳定的 Pickering 乳液中也报告了类似的结果<sup>[43]</sup>。图 10B 显示了紫外光照对 CPE 中的游离多酚和封装在  $W_1/O/W_2$  乳液中的多酚的影响。CPE 的总多酚保留率在前 8 h 内迅速下降至 64.79%, 而此时  $W_1/O/W_2$  乳液的总多酚保留率仍高达 89.43%。随着紫外光照时间的进一步延长, CPE 和乳液的总多酚保留率缓慢下降, 48 h 后  $W_1/O/W_2$  乳液的总多酚保留率降至 68.29%, 但仍高于 CPE 的总多酚保留率(52.08%), 该结果表明双重乳液结构能够有效降低紫外光照对总多酚的降解作用。

### 2.3.2 $W_1/O/W_2$ 乳液体外消化特性

**2.3.2.1 体外消化稳定性** 由图 11A 可见, 体外消化前双重乳液液滴结构较为完整。经模拟胃消化后, 乳液液滴明显增大, 并且部分液滴坍塌延伸, 导致内层  $W_1$  相逐渐释放至外层  $W_2$  相中。这主要是由于 SGF 环境 pH 低、离子强度高, 并且胃蛋白酶会降解液滴表面的蛋白质, 导致液滴间静电排斥力减小, 引起液滴聚集或絮凝, 乳液稳定性下降<sup>[44]</sup>。经模拟肠消化后, 乳液的双重液滴结构被进一步破坏, 液滴尺寸大幅减小。这是由于乳液外层的蛋白质和多糖被降解后, 液滴界面张力增加, 导致内层的油相以及其捕获

的生物活性物质释放至 SIF 环境中。油相会在胰蛋白酶的作用下分解为游离脂肪酸、单酰基甘油和二酰基甘油等脂质消化产物, 导致其难以保持原始形状并分散成小液滴<sup>[45]</sup>。

**2.3.2.2 游离脂肪酸释放率** 监测肠道消化中的 FFA 释放率的变化可用于评估脂质水解的程度。由图 11B 可见, 两组测试组中 FFA 释放率均随着消化时间的增加而呈现先上升后平缓的趋势, 然而整个消化过程中, 乳液样品的 FFA 释放率均明显高于游离大豆油。经模拟肠道消化 120 min 后, 游离大豆油中 FFA 释放率仅为 44.23%, 而乳液的 FFA 释放率已达 86.02%, 这表明乳液中的油相更易在 SIF 环境中被降解, 从而更快地释放出内部捕获的生物活性成分, 被人体吸收。造成这种现象的原因可能是与游离的油相比, CSDF-G 稳定的  $W_1/O/W_2$  乳液的液滴尺寸更小, 这为脂肪酶提供了更大的比表面积, 导致胆盐在界面处快速置换, 使脂肪酶更容易与油相结合, 加快脂脂分解<sup>[46]</sup>。

**2.3.2.3 生物可及性** 图 11C 显示了模拟胃肠道消化后游离大豆油的和乳液负载的 CPE 的总多酚生物可及性。游离大豆油负载的 CPE 的总多酚生物可及性最低, 仅为 55.87%, 主要是由于多酚类成分在 SIF 环境中稳定性较差。经包封后, CPE 的总多酚生

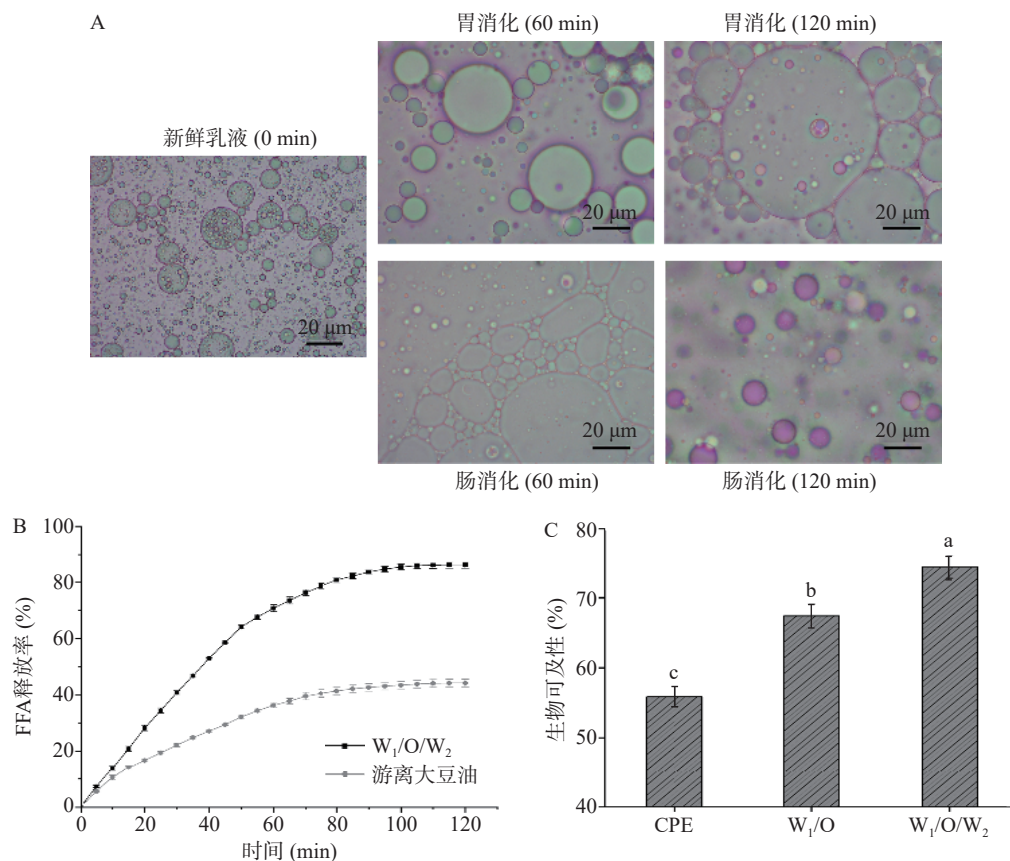


图 11  $W_1/O/W_2$  乳液在模拟胃肠道消化过程中的微观形态(A)、模拟肠消化过程中的游离脂肪酸(FFA)释放率随时间变化(B)和模拟体外消化后总多酚的生物可及性(C)

Fig.11 Micromorphological images of  $W_1/O/W_2$  emulsions during simulated gastrointestinal digestion (A), release rate of free fatty acid (FFA) over time during simulated intestinal digestion (B) and bioaccessibility of total polyphenols after simulated *in vitro* digestion (C)



物可及性显著提高,其中  $W_1/O/W_2$  乳液中多酚生物可及性最高,达到 74.43%,较游离大豆油和  $W_1/O$  乳液分别提高了 33.22% 和 10.39%,表明  $W_1/O/W_2$  乳液提高了多酚在胃肠道消化环境中的稳定性。这可能是由于在  $W_1/O/W_2$  乳液中,总多酚与外层水相分离,在很大程度上避免了其与消化液的接触<sup>[47]</sup>。这些结果表明,由 CSDF-G 稳定的  $W_1/O/W_2$  乳液在作为生物活性成分递送体系方面应用潜力较大,可有效提高生物活性化合物的生物可及性。

### 3 结论

本研究利用两步乳化法,以 PGPR 作为内层亲油性乳化剂,以 CSDF-G 非共价复合物作为外层亲水性乳化剂制备  $W_1/O/W_2$  双重乳液,并对乳液的制备条件进行了优化。此外,对优化后的负载 CPE 的  $W_1/O/W_2$  双重乳液的稳定性进行考察,发现乳液在 pH3.0~5.0 和较低的离子强度 0~100 mmol/L 范围内具有较高的稳定性。双重乳液中总多酚的保留率随着温度的升高和加热时间的延长而降低。在紫外灯的照射下,游离 CPE 中多酚迅速降解,48 h 后总多酚的保留率仅为 52.08%,而  $W_1/O/W_2$  乳液中的总多酚保留率仍有 68.29%。体外消化结果表明, $W_1/O/W_2$  乳液中游离脂肪酸的释放量高于游离的大豆油,可能与乳液更小的液滴尺寸提供了更大的表面积有关,促进了脂肪酶对油脂的分解作用。并且本研究制备  $W_1/O/W_2$  乳液可以显著提高 CPE 中总多酚的生物利用度。本研究说明了 CSDF-G 复合物在作为食品乳液稳定剂具有较大的潜力,并且所制备的  $W_1/O/W_2$  乳液为植物提取活性成分的负载和递送体系的开发提供思路。

© The Author(s) 2025. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

### 参考文献

- [1] DAI G, WU L, ZHAO J, et al. Classification of pericarpium citri reticulatae (Chenpi) age using surface-enhanced Raman spectroscopy[J]. *Food Chemistry*, 2023, 408: 135210.
- [2] DUAN L, DOU L L, YU K Y, et al. Polymethoxyflavones in peel of *Citrus reticulata* 'Chachi' and their biological activities[J]. *Food Chemistry*, 2017, 234: 254–261.
- [3] ZHAO J, YANG J, XIE Y. Improvement strategies for the oral bioavailability of poorly water-soluble flavonoids: An overview[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2019, 570: 118642.
- [4] LU W, KELLY A L, MIAO S. Emulsion-based encapsulation and delivery systems for polyphenols[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2016, 47: 1–9.
- [5] ESTÉVEZ M, GÜELL C, DE LAMO-CASTELLVÍ S, et al. Encapsulation of grape seed phenolic-rich extract within W/O/W emulsions stabilized with complexed biopolymers: Evaluation of their stability and release[J]. *Food Chemistry*, 2019, 272: 478–487.
- [6] KUMAR A, KAUR R, KUMAR V, et al. New insights into water-in-oil-in-water (W/O/W) double emulsions: Properties, fabrication, instability mechanism, and food applications[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2022, 128: 22–37.
- [7] RIBEIRO E F, MORELL P, NICOLETTI V R, et al. Protein- and polysaccharide-based particles used for Pickering emulsion stabilisation[J]. *Food Hydrocolloids*, 2021, 119: 106839.
- [8] LIANG Z, CHU H, HOU Z, et al. W/O/W emulsions stabilized with whey protein concentrate and pectin: Effects on storage, pasteurization, and gastrointestinal viability of *Lactocaseibacillus rhamnosus*[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 232: 123477.
- [9] LI B, JIANG Y, LIU F, et al. Synergistic effects of whey protein-polysaccharide complexes on the controlled release of lipid-soluble and water-soluble vitamins in W1/O/W2 double emulsion systems[J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2012, 47(2): 248–254.
- [10] XIONG M, FENG M, CHEN Y, et al. Comparison on structure, properties and functions of pomegranate peel soluble dietary fiber extracted by different methods[J]. *Food Chemistry: X*, 2023, 19: 100827.
- [11] MOCZKOWSKA M, KARP S, NIU Y, et al. Enzymatic, enzymatic-ultrasonic and alkaline extraction of soluble dietary fibre from flaxseed—A physicochemical approach[J]. *Food Hydrocolloids*, 2019, 90: 105–112.
- [12] LI Y, LAI P, CHEN J, et al. Extraction optimization of polyphenols, antioxidant and xanthine oxidase inhibitory activities from *Prunus salicina* Lindl[J]. *Food Science and Technology*, 2016, 36.
- [13] 国家市场监督管理总局, 国家卫生健康委员会 GB 5009.88-2023 食品安全国家标准 食品中膳食纤维的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2023. [State Administration for Market Regulation, National Health Commission. GB 5009.88-2023. National standards for food safety. Determination of dietary fiber in food[S]. Beijing: Standards Press of China, 2023.]
- [14] CARPENTIER J, CONFORTO E, CHAIGNEAU C, et al. Complex coacervation of pea protein isolate and tragacanth gum: Comparative study with commercial polysaccharides[J]. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2021, 69: 102641.
- [15] ZHANG Y, TAN C, ZHANG X, et al. Effects of maltodextrin glycosylation following limited enzymatic hydrolysis on the functional and conformational properties of soybean protein isolate[J]. *European Food Research and Technology*, 2014, 238(6): 957–968.
- [16] LAUREANTIE J G, PAIVATS, DEMATOS JORGEL M, et al. Microencapsulation of bioactive compound extracts using maltodextrin and gum arabic by spray and freeze-drying techniques[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 253: 126969.
- [17] SHEN F, WANG T, ZHANG R, et al. Metabolism and release of characteristic components and their enzymatic mechanisms in pericarpium citri reticulatae co-fermentation[J]. *Food Chemistry*, 2024, 432: 137227.
- [18] WU B C, MCCLEMENTS D J. Microgels formed by electrostatic complexation of gelatin and OSA starch: Potential fat or starch mimetics[J]. *Food Hydrocolloids*, 2015, 47: 87–93.
- [19] SOUZAC J F, SOUZAC S F, HECKERT BASTOS L P, et al. Interpolymer complexation of egg white proteins and carrageenan: Phase behavior, thermodynamics and rheological properties[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 109: 467–475.
- [20] HU K, MCCLEMENTS D J. Fabrication of biopolymer nanoparticles by antisolvent precipitation and electrostatic deposition: Zein-alginate core/shell nanoparticles[J]. *Food Hydrocolloids*, 2015, 44: 101–108.

- [21] ZHAO N, ZOU H, SUN S, et al. The interaction between sodium alginate and myofibrillar proteins: The rheological and emulsifying properties of their mixture[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 161: 1545–1551.
- [22] WANG X, CHEN S, CUI Q, et al. Effect of pH on freeze-thaw stability of glycosylated soy protein isolate[J]. *Journal of Oleo Science*, 2019, 68(3): 281–290.
- [23] CHEON J, HAJI F, BAEK J, et al. Pickering emulsions for functional food systems[J]. *Journal of Agriculture and Food Research*, 2023, 11.
- [24] EVANS M, RATCLIFFE I, WILLIAMS P A. Emulsion stabilisation using polysaccharide-protein complexes[J]. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2013, 18(4): 272–282.
- [25] TANG Q, HUANG G. Improving method, properties and application of polysaccharide as emulsifier[J]. *Food Chemistry*, 2022, 376: 131937.
- [26] MA X, YAN T, HOU F, et al. Formation of soy protein isolate (SPI)-citrus pectin (CP) electrostatic complexes under a high-intensity ultrasonic field: Linking the enhanced emulsifying properties to physicochemical and structural properties[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2019, 59: 104748.
- [27] WANG N, ZHAO X, JIANG Y, et al. Enhancing the stability of oil-in-water emulsions by non-covalent interaction between whey protein isolate and hyaluronic acid[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 225: 1085–1095.
- [28] CAI Z, WEI Y, SHI A, et al. Correlation between interfacial layer properties and physical stability of food emulsions: Current trends, challenges, strategies, and further perspectives[J]. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2023, 313: 102863.
- [29] DICKINSON E. Structuring of colloidal particles at interfaces and the relationship to food emulsion and foam stability[J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2015, 449: 38–45.
- [30] LIU X Y, HE T S, WANG C C, et al. Modulation of pea protein isolate nanoparticles by interaction with OSA-corn starch: Enhancing the stability of the constructed Pickering emulsions[J]. *Food Chemistry*, 2024, 437: 137766.
- [31] ZHUANG H, LI X, WU S, et al. Fabrication of grape seed proanthocyanidin-loaded W/O/W emulsion gels stabilized by polyglycerol polyricinoleate and whey protein isolate with konjac glucomannan: Structure, stability, and *in vitro* digestion[J]. *Food Chemistry*, 2023, 418: 135975.
- [32] ZHANG K, SHEN R, ZHANG Y, et al. Modulating *in vitro* gastrointestinal digestion of nanocellulose-stabilized pickering emulsions by altering particle surface charge[J]. *Food Chemistry*, 2024, 434: 137521.
- [33] XIAO J, WANG X A, PEREZ GONZALEZ A J, et al. Kafirin nanoparticles-stabilized Pickering emulsions: Microstructure and rheological behavior[J]. *Food Hydrocolloids*, 2016, 54: 30–39.
- [34] SHARKAWY A, BARREIRO M F, RODRIGUES A E. Preparation of chitosan/gum Arabic nanoparticles and their use as novel stabilizers in oil/water Pickering emulsions[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2019, 224: 115190.
- [35] ZENG T, WU Z L, ZHU J Y, et al. Development of antioxidant Pickering high internal phase emulsions (HIPEs) stabilized by protein/polysaccharide hybrid particles as potential alternative for PHOs[J]. *Food Chemistry*, 2017, 231: 122–30.
- [36] HUANG H, BELWAL T, AALIM H, et al. Protein-polysaccharide complex coated W/O/W emulsion as secondary microcapsule for hydrophilic arbutin and hydrophobic coumaric acid[J]. *Food Chemistry*, 2019, 300: 125171.
- [37] FU L, GU Q, ZHANG S, et al. Simultaneous extraction and encapsulation of polyphenols from *Cajanus cajan* leaves and the evaluation of their biological activity[J]. *Microchemical Journal*, 2023, 193: 109187.
- [38] LI H, SONG J, LIU C, et al. Corn starch/ $\beta$ -cyclodextrin composite nanoparticles for encapsulation of tea polyphenol and development of oral targeted delivery systems with pH-responsive properties[J]. *Food Hydrocolloids*, 2024, 151: 109823.
- [39] BERTRAND M, XIA S, CAI J, et al. Gelatin and pectin complex coacervates as carriers for cinnamaldehyde: Effect of pectin esterification degree on coacervate formation, and enhanced thermal stability[J]. *Food Hydrocolloids*, 2018, 87: 712–722.
- [40] LI Y, LIU J, MA S, et al. Co-assembly of egg white-derived peptides and protein-polysaccharide complexes for curcumin encapsulation: The enhancement of stability, redispersibility, and bioactivity[J]. *Food Chemistry*, 2022, 394: 133496.
- [41] XU X, LUO L, LIU C, et al. Influence of electrostatic interactions on behavior of mixed rice glutelin and alginate systems: pH and ionic strength effects[J]. *Food Hydrocolloids*, 2017, 63: 301–308.
- [42] QIAN C, DECKER E A, XIAO H, et al. Physical and chemical stability of  $\beta$ -carotene-enriched nanoemulsions: Influence of pH, ionic strength, temperature, and emulsifier type[J]. *Food Chemistry*, 2012, 132(3): 1221–1229.
- [43] MWANGI W W, HO K W, TEY B T, et al. Effects of environmental factors on the physical stability of pickering-emulsions stabilized by chitosan particles[J]. *Food Hydrocolloids*, 2016, 60: 543–550.
- [44] DING M, LIU L, ZHANG T, et al. Effect of interfacial layer number on the storage stability and *in vitro* digestion of fish oil-loaded multilayer emulsions consisting of gelatin particle and polysaccharides[J]. *Food Chemistry*, 2021, 336: 127686.
- [45] LI L, ZHANG M, FENG X, et al. Internal/external aqueous-phase gelation treatment of soybean lipophilic protein W/O/W emulsions: Improvement in microstructure, interfacial properties, physicochemical stability, and digestion characteristics[J]. *Food Hydrocolloids*, 2023, 136: 108257.
- [46] YI J, LI Y, ZHONG F, et al. The physicochemical stability and *in vitro* bioaccessibility of beta-carotene in oil-in-water sodium caseinate emulsions[J]. *Food Hydrocolloids*, 2014, 35: 19–27.
- [47] HUANG Y, LIN J, TANG X, et al. Grape seed proanthocyanidin-loaded gel-like W/O/W emulsion stabilized by genipin-crosslinked alkaline soluble polysaccharides-whey protein isolate conjugates: Fabrication, stability, and *in vitro* digestion[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 186: 759–769.