

香草兰挥发油纳米微乳液制备及稳定性评价

杜 敏^{1,2}, 董 丽², 唐 冰^{1,3,4,5}, 胡小松², 张彦军^{1,3,4,5}, 徐 飞^{1,3,4,5*}

1. 中国热带农业科学院香料饮料研究所, 海南万宁 571533; 2. 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100000; 3. 国家重要热带作物工程技术研究中心, 海南万宁 571533; 4. 海南省热带香料饮料作物工程技术研究中心, 海南万宁 571533; 5. 海南省特色热带作物适宜性加工与品质控制重点实验室, 海南万宁 571533

摘 要: 为改善香草兰挥发油水溶性差、稳定性低等问题, 以马达加斯加香草兰豆荚提取得到的香草兰挥发油作为主要原料, 采取自发乳化法构建香草兰挥发油纳米微乳化体系并对其稳定性进行评价。结果表明: 香草兰挥发油纳米微乳液最佳组成为表面活性剂 Tween 40 与助表面活性剂丙二醇的质量比为 2, 混合表面活性剂与油相的质量比为 9 : 1, 可得到水包油型 (O/W) 香草兰挥发油纳米微乳液, 纳米微乳液的粒径为 $(16.75\pm0.06)\text{nm}$, 聚合物分散系数 (PDI) 为 0.240 ± 0.003 , Zeta 电位为 $(-3.15\pm0.46)\text{V}$ 。采用离心法、加热法以及低温贮藏法对香草兰挥发油纳米微乳液进行稳定性评价。结果表明, 在离心速率为 2000~10 000 r/min, 加热温度为 40~90 ℃条件下, 香草兰挥发油纳米微乳液能保持澄清、透明状态, 在 4 ℃条件下放置 30 d, 未产生浑浊、沉淀等现象, 表明香草兰挥发油纳米微乳液具有良好的离心稳定性、热稳定性以及贮藏稳定性。研究结果为香草兰挥发油的应用提供一定的技术支撑。

关键词: 香草兰挥发油; 纳米微乳液; 稳定性; 评价

中图分类号: TQ654.2

文献标志码: A

Preparation and Stability Evaluation of Vanilla Volatile Oil Nano-Microemulsion

DU Min^{1,2}, DONG Li², TANG Bing^{1,3,4,5}, HU Xiaosong², ZHANG Yanjun^{1,3,4,5}, XU Fei^{1,3,4,5*}

1. Spices and Beverage Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Wanning, Hainan 571533, China; 2. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100000, China; 3. National Center of Important Tropical Crops Engineering and Technology Research, Wanning, Hainan 571533, China; 4. Hainan Tropical Spices Beverage Crop Engineering Technology Research Center, Wanning, Hainan 571533, China; 5. Key Laboratory of Processing Suitability and Quality Control of the Special Tropical Crops of Hainan Province, Wanning, Hainan 571533, China

Abstract: In order to solve the problems of poor water solubility and low stability of vanilla volatile oil, the vanilla volatile oil extracted from Madagascar vanilla pods was used as the main raw material, and the nano-emulsification system of vanilla volatile oil was constructed by the spontaneous emulsification method and stability was evaluated. The results showed that the optimal process formula of vanilla volatile oil nano-microemulsion was the mass ratio of surfactant to co-surfactant was 2, and the mass ratio of mixed surfactant to oil phase was 9 : 1, and O/W vanilla volatile oil nano-microemulsion could be obtained, and the particle size of the nano-microemulsion was $(16.75\pm0.06)\text{nm}$, and the polymer dispersity index (PDI) was 0.240 ± 0.003 . The Zeta potential was $(-3.15\pm0.46)\text{V}$. The results showed that the vanilla volatile oil nano-microemulsion could remain clear and transparent under the conditions of centrifugation rate of 2000–10 000 r/min and heating temperature of 40–90 ℃, and was placed at 4 ℃ for 30 days without turbidity and precipitation, indicating that the vanilla volatile oil nano-emulsion had good centrifugal stability, thermal stability and storage stability. The results would provide some technical support for the application of vanilla volatile oil and nano

收稿日期 2024-05-07; 修回日期 2024-08-09

基金项目 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (No. 1630142022008); 海南省重点研发计划项目 (No. ZDYF2022 XDNY268); 三亚崖州湾科技城科技专项 (No. SCKJ-JYRC-2022-25)。

作者简介 杜 敏 (2000—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品加工与安全。*通信作者 (Corresponding author): 徐 飞 (XU Fei), E-mail: xufei_0302054@163.com。

microemulsion.

Keywords: vanilla volatile oil; nano-microemulsion; stability; evaluation

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2025.02.018

香草兰 (*Vanilla planifolia* Andrews) 属兰科香子兰属, 是一种多年生热带藤本植物, 果实为肉质荚果状, 常称之为豆荚。香草兰豆荚成熟时自身无香气, 通过杀青、发汗、干燥等过程使其具有丰富的香气物质^[1], 从豆荚中提取的挥发性物质具有独特的香味^[2-4]。因此, 以微生物发酵后的香草兰豆荚为原料通过水蒸气蒸馏、超临界二氧化碳萃取等方法提取得到天然香精——香草兰挥发油, 香草兰挥发油具有浓郁的香气和风味, 是世界上最受欢迎的香料之一^[5]。据联合国粮食及农业组织统计, 世界范围内香草兰种植面积约 9.6 万 hm^2 , 总产量约 7500 t, 年进出口总量 2000~3000 t, 马达加斯加和印度尼西亚的香草兰种植面积占全球的 85%, 香草兰在我国的种植主要分布在海南、云南、广东等热带地区^[6]。香草兰除用作香料以外, 还具有健胃、补肾、软化血管以及促进脑功能改善等功效, 其相关产品在国际上供不应求, 目前主要在高档食品、高档化妆品等行业中已有广泛应用, 但是香草兰挥发油水溶性差, 容易受到氧气、光照、温度等条件的影响, 限制了其应用范围^[7]。

由油相、水相、表面活性剂和助表面活性剂组成的纳米微乳液是一种稳定体系, 粒径在 1~100 nm 之间, 与普通乳液相比, 纳米微乳液具有颗粒分布均匀、粒径小、稳定性好等优点^[8-9]。微乳技术对挥发油等水不溶性物质具有较强的增溶能力, 可以有效改善其不溶于水、稳定性差等缺点, 从而提高挥发油的利用率^[10-11]。ALMASI 等^[12]制备了百里香精油微乳体系的海藻酸钙抗菌膜, 与百里香精油相比, 该体系明显提高了牛肉中食源性致病菌的抗菌活性, 能够有效延长食品的保质期。CHEN 等^[13]将白藜芦醇制成纳米微胶囊, 该制剂比游离的白藜芦醇具有更强的抗氧化能力、更低的细胞毒性以及更高的稳定性, 可增强白藜芦醇在心血管疾病方面的保健作用。EMTIAZI 等^[14]制备了千里香精油的纳米脂质体和纳米囊泡, 与千里香精油相比, 2 种纳米体系对乳腺癌细胞 MCF-7 均具有很好的细胞毒性, 为乳腺癌提供了一种新颖、高潜力的治疗方法。

香草兰挥发油为黄色液体, 具有稳定性差、挥发性强、不溶于水等特点, 鉴于此, 纳米微乳液作为一种载体, 可以改善挥发油的溶解度, 提高香草兰挥发油的稳定性及利用价值^[10]。本研究以香草兰挥发油为油相, 采用自乳化法制备香草兰挥发油纳米微乳液, 对制备工艺进行优化得到水包油型 (O/W) 纳米微乳液, 对制备的挥发油纳米微乳液进行表征及稳定性评价, 以提高香草兰挥发油的应用范围。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试材料 香草兰豆荚购自莱柏特芳香科技(成都)有限公司, 为墨西哥香草兰, 通过烘干、粉碎、超临界二氧化碳萃取得到香草兰挥发油。

1.1.2 主要试剂 Tween 40、Tween 60、Tween 80、甘油、丙二醇均为食品级, 购自 Roll Into One Emulsifier Co. Ltd.; 无水乙醇(分析纯)购自西陇科学股份有限公司; 亚甲基蓝(指示剂级)、苏丹IV(分析纯)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

1.1.3 仪器与设备 AL104 电子天平, 梅特勒-托利多仪器有限公司; HJ-4 恒温磁力加热搅拌器, 江苏金坛宏华仪器厂; Zetasizer nano ZS 90 激光粒度分析仪, 马尔文仪器有限公司; CTI18RT 台式高速冷冻离心机, 上海天美仪器科技有限公司; SynergyH1 全波长扫描式多功能读数仪, 美国伯腾仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 香草兰挥发油纳米微乳液的制备 采用自乳化法^[15-16]制备香草兰挥发油纳米微乳液: 将表面活性剂与助表面活性剂按一定质量比 (Km) 进行混合, 再按照混合表面活性剂与挥发油质量比 (S/O) 1:9、2:8、3:7、4:6、5:5、6:4、7:3、8:2、9:1 进行混合, 以 400 r/min 搅拌 15 min, 然后向体系中边搅拌边逐滴加水相, 直至最终形成澄清透明的纳米微乳液^[17]。

1.2.2 伪三元相图的绘制 在滴加水相的过程中, 观察并记录体系由浑浊到透明且不发生变化

时的去离子水质量, 计算香草兰挥发油、去离子水、混合表面活性剂的质量百分比, 用 Origin 2021 软件绘制伪三元相图, 并计算微乳面积百分比。

1.2.3 微乳配方的筛选 (1) 表面活性剂的筛选。设定 $Km=2$, 以甘油为助表面活性剂, 水相为去离子水, 按照 1.2.1 的方法制备纳米微乳液。

(2) 助表面活性剂的筛选。设定 $Km=2$, 在 1.2.3-(1) 中筛选出来的表面活性剂的基础上, 按照 1.2.1 的方法制备纳米微乳液。

(3) 表面活性剂与助表面活性剂质量比 (Km) 的筛选。在 1.2.3-(1) 和 1.2.3-(2) 的基础上, 设定 Km 值为 1、0.5、0.3、0.25、2、3、4, 按照 1.2.1 的方法进行纳米微乳液的制备。

1.2.4 纳米微乳液的表征及稳定性分析 (1) 纳米微乳液的外观及粒径。将制备的微乳样品在室温下平衡 48 h, 用激光粒度分析仪测定乳液粒径和聚合物分散系数 (PDI) 以及 Zeta 电位, 每个样品重复测定 3 次。

(2) 染色法鉴定纳米微乳液的类型。取乳液置于透明玻璃瓶中, 分别加入亚甲基蓝 (1.0 g/L) 和苏丹 IV (1.0 g/L) 染色液各 2 滴, 于静止状态下观察 2 种指示剂在纳米微乳液中的扩散速度, 若亚甲基蓝快于苏丹 IV, 说明制备的纳米微乳液是水包油 (O/W) 型, 反之为油包水型 (W/O), 二者的扩散速度相当则说明该纳米微乳液为双连续型^[18]。

1.2.5 纳米微乳液稳定性评价 (1) 离心稳定性。通过测定乳液的吸光度变化对乳液的离心稳定性进行评价, 将制备的乳液于 2000~10 000 r/min 下离心 30 min, 观察是否分层, 在 550 nm 波长处检测离心前后乳液的吸光度, 透光率计算公式如下:

$$\text{透光率} = \frac{A_0}{A_1} \times 100\%$$

式中, A_0 为离心前吸光度, A_1 为离心后吸光度^[19]。

(2) 热稳定性。采用水浴加热法评价乳液的热稳定性, 于 40~90 °C 条件下将乳液加热 30 min, 在 550 nm 波长处检测其加热前后的吸光度, 透光率计算公式如下:

$$\text{透光率} = \frac{A_2}{A_3} \times 100\%$$

式中, A_2 为加热前吸光度, A_3 为加热后吸光度^[20]。

(3) 贮藏稳定性。将纳米微乳液置于 4 °C 冰箱中保存 30 d, 每隔 7 d 在 550 nm 处测定样品的

吸光度, 并计算纳米微乳液贮藏前后的透光率, 透光率计算公式如下:

$$\text{透光率} = \frac{A_4}{A_5} \times 100\%$$

式中, A_4 为贮藏前吸光度, A_5 为贮藏后吸光度。

1.3 数据处理

采用 Excel 2016 软件对试验数据进行整理与统计, 利用 Origin 2021 软件绘制伪三元相图, 采用 SPSS 27.0 软件进行差异显著性分析 ($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 表面活性剂的筛选

表面活性剂是微乳体系的重要组成部分之一, 通过降低液体的表面张力促进乳液的形成^[21], 而吐温系列表面活性剂在食品、化妆品以及医药等行业应用广泛^[22]。通过分析表面活性剂对香草兰挥发油微乳液形成的影响, 结果表明, 不同的表面活性剂与油相形成的状态不同, 甘油与 Tween 40 能够与香草兰挥发油在 S/O (9:1、8:2) 时形成澄清透明或半透明体系 (表 1)。当 $Km=2$ 时, Tween 40 纳米微乳液面积比为 2.44%, 而表面活性剂 Tween 60、Tween 80 与香草兰挥发油不能自发形成纳米微乳液 (图 1)。不同表面活性剂的亲水亲油平衡值 (HLB) 有差异, 可将其作为制备微乳液选择表面活性剂的参考。表面活性剂的 HLB 值通常介于 8~18 之间, 在这个范围内, 表面活性剂的亲水性与 HLB 值呈正比^[23-24]。表面活性剂 Tween 40 的 HLB 值相对较大, 且形成的微乳面积也最大 (表 2), 因此, 为了制备合适的水包油型 (O/W) 纳米微乳液, 选择 Tween 40 作为表面活性剂。

表 1 不同表面活性剂与油相形成的溶液状态

Tab. 1 State of solution formed by different surfactants and oil phase

助表面活性剂 Co-surfactant	表面活性剂 Surfactant	S/O	状态 State
甘油	Tween 40	9:1	澄清透明
		8:2	澄清半透明
		7:3	乳白色且浑浊
	Tween 60	9:1	澄清半透明
		8:2	乳白色且浑浊
	Tween 80	9:1	澄清透明
		8:2	乳白色且浑浊

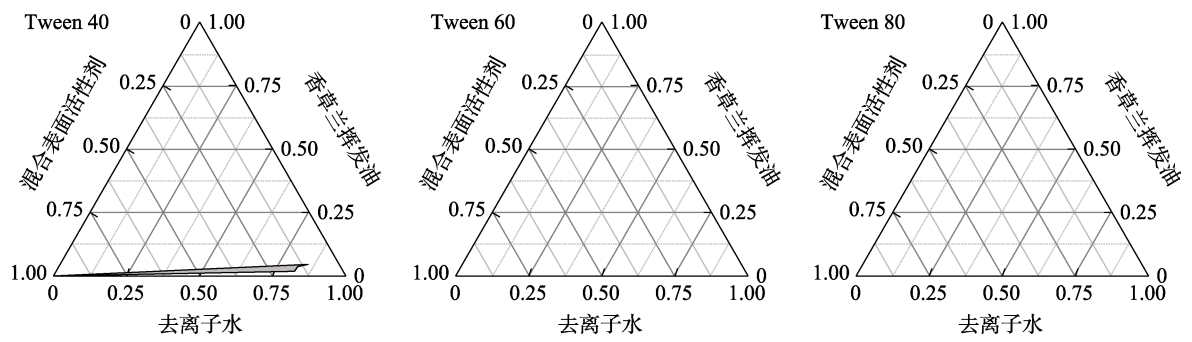


图 1 不同表面活性剂的香草兰挥发油微乳伪三元相图

Fig. 1 Pseudo-ternary phase diagram of vanilla volatile oil microemulsion with different surfactants

表 2 表面活性剂对香草兰挥发油微乳伪三元相图的影响

Tab. 2 Effect of surfactants on microemulsion pseudo-ternary phase diagram of vanilla volatile oil

表面活性剂 Surfactant	HLB 值 HLB value	疏水链长 Hydrophobic chain	面积比 Area ratio/%
Tween 40	15.6	16	2.44
Tween 60	14.9	18	0
Tween 80	15.0	18	0

2.2 助表面活性剂的筛选

通过分析不同助表面活性剂对微乳液形成的影响，结果表明，丙二醇与 Tween 40 作为混合表面活性剂时与香草兰挥发油更易形成澄清透明微乳液状态（表 3），形成的微乳区域最大（图 2）。不同助表面活性剂微乳区域面积百分比顺序：丙二醇>无水乙醇>甘油（表 4）。研究表明，助表面活性剂单独使用不能构成稳定的微乳体

系，但是与表面活性剂协同使用可进一步降低界面张力^[25]。

表 3 不同助表面活性剂与油相形成的溶液状态

Tab. 3 State of the solution formed by different co-surfactants and oil phase

表面活性剂 Surfactant	助表面活性剂 Co-surfactant	S/O	状态 State
Tween40	甘油	9：1	澄清透明
		8：2	澄清半透明
		7：3	乳白色且浑浊
	无水乙醇	9：1~8：2	澄清透明
		7：3	澄清半透明
		6：4	乳白色且浑浊
	丙二醇	9：1~8：2	澄清透明
		7：3~6：4	澄清半透明
		5：5	乳白色且浑浊

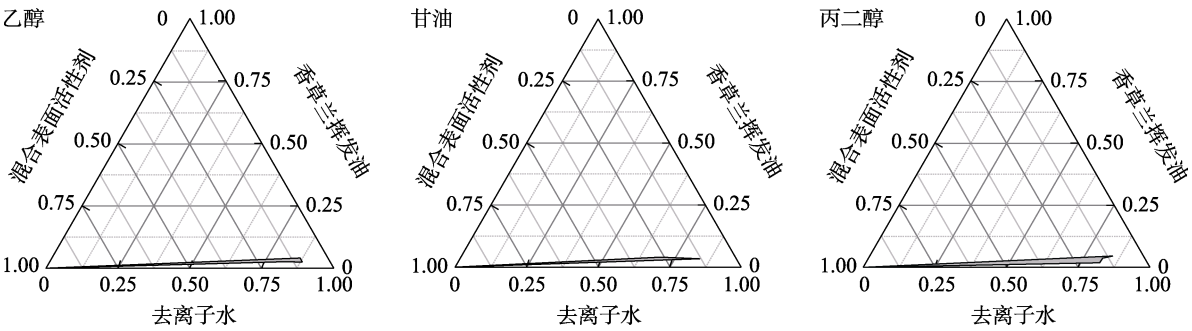


图 2 不同助表面活性剂的香草兰挥发油纳米微乳液伪三元相图

Fig. 2 Pseudo-ternary phase diagram of vanilla volatile oil emulsion with different co-surfactants

表 4 不同助表面活性剂形成的微乳面积比

Tab. 4 The ratio of microemulsion area formed by different co-surfactants

表面活性剂 Surfactant	助表面活性剂 Co-surfactant	面积比 Area ratio/%
Tween 40	无水乙醇	1.41
	甘油	1.17
	丙二醇	2.44

2.3 表面活性剂与助表面活性剂质量比（Km）的筛选

体系中表面活性剂和助表面活性剂的含量对微乳的形成具有重要影响。由表 5 可知，当 Km 为 0.5、0.3、0.25 时，只有 S/O 为 9：1 时能够形成微乳；Km 为 2 时，S/O 从 9：1~6：4 均能形成微乳。由图 3 和表 6 可知，当 Km 为 2 时形成的

微乳面积最大,为 2.44%。 K_m 值逐渐减小时,表面活性剂占比减小,油水界面张力减小导致表面活性剂基团之间吸引力降低,油相与表面活性剂作用不充分,使香草兰挥发油纳米微乳液形成稳定体系能力降低,导致微乳区域面积逐渐变小^[26]。与之相反, K_m 值逐渐增大,助表面活性剂占比减少使其协同乳化作用降低,使微乳区域面积相对减少^[27-28]。另外, K_m 为 3、4 时形成的微乳面积区域比 K_m 为 2 的小,因此选择 K_m 为 2 的比例进行纳米微乳液的制备。

2.4 纳米微乳液粒径

微乳是一种热力学稳定体系,液滴大小和粒径分布是表征其物理稳定性的重要参数^[29]。不同 S/O 的微乳粒径如表 7 所示,在 9:1~6:4 之间,制备的纳米微乳液粒径均在 10~100 nm 之间,但 9:1 比例制备的纳米微乳液粒径最小,为 $(16.75\pm0.06)\text{nm}$ 。粒径分布图呈正态分布(图 4),表明 S/O 为 9:1 时,形成的乳液粒径主要分布在 10~100 nm 范围且呈单峰分布,表明该乳液均一性较好。聚合物分散指数(PDI)是反映乳液粒径是否均一的重要指标,PDI 值越小表示粒径分布越窄、分散性越好^[30]。S/O 在 9:1~6:4 之间时纳米微乳液 PDI 均在 0~1 之间,S/O 为 9:1 时纳米微乳液 PDI 最小,为 0.240 ± 0.003 。另外,Zeta

电位对乳液稳定性也具有重要的参考意义,其绝对值越大表明乳液的稳定性越好^[31]。S/O 为 6:4 时,其纳米微乳液的 Zeta 电位绝对值最大,但与 9:1 的 Zeta 电位绝对值相差不大,且其粒径和 PDI 均大于 9:1,而澄清透明程度低于 9:1;且 9:1 的 Zeta 电位分布图呈正态分布(图 5),表

表 5 不同质量比 (K_m) 的表面活性剂与助表面活性剂与油相形成纳米微乳液的状态

Tab. 5 Different mass ratio (Km) of surfactants and co-surfactants form an emulsion with oil phase				
表面活性剂 Surfactant	助表面活性剂 Co-surfactant	Km	S/O	状态 State
Tween 40	丙二醇	1	9：1~8：2	澄清透明
			7：3	澄清半透明
		2	9：1~8：2	澄清透明
			7：3~6：4	澄清半透明
		3	9：1~8：2	澄清透明
			7：3~6：4	澄清半透明
		4	9：1~7：3	澄清透明
			0.5	9：1
		0.3	8：2	乳白色且浑浊
			9：1	澄清透明
		0.25	8：2	乳白色且浑浊
			9：1	澄清透明
		8：2	乳白色且浑浊	

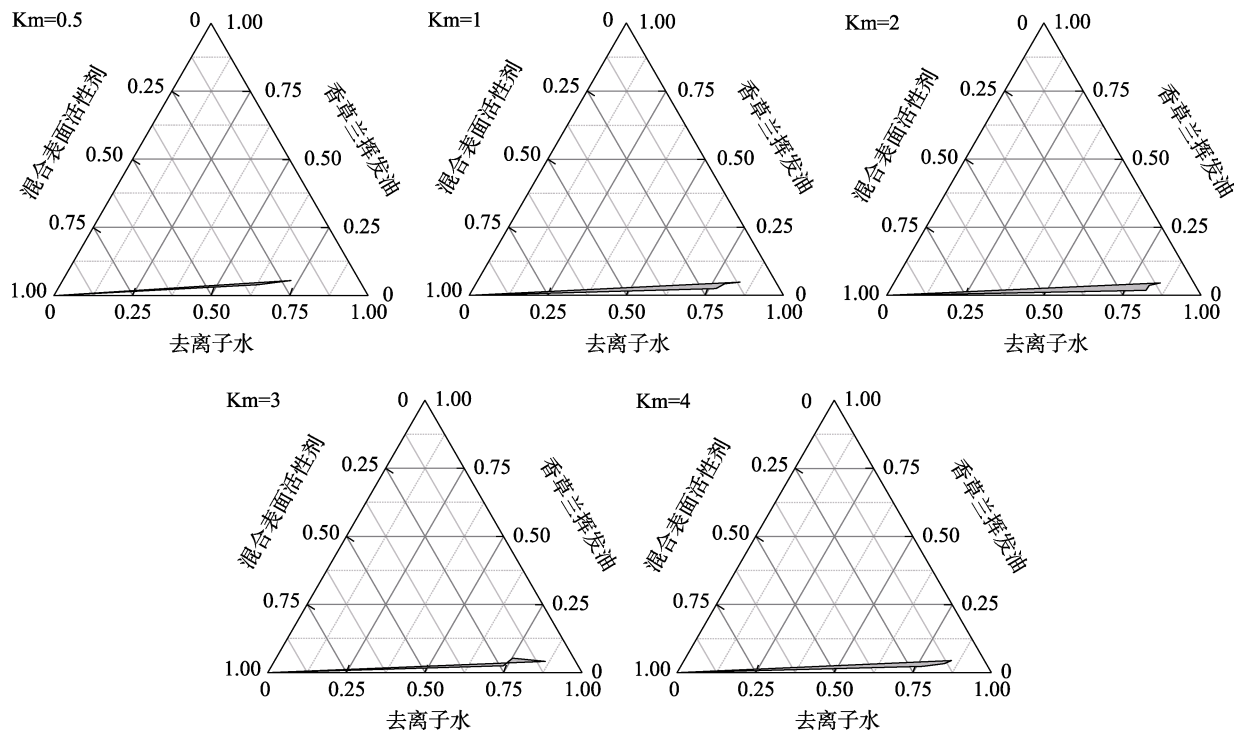


图 3 不同 K_m 值对香草兰挥发油纳米微乳液伪三元相图的影响

Fig. 3 Effect of different K_m values on pseudo-ternary phase diagram of vanilla volatile oil emulsion

表 6 不同 Km 值形成的香草兰挥发油微乳面积比
Tab. 6 Area ratio of vanilla volatile oil microemulsion formed by different Km values

表面活性剂 Surfactant	助表面活性剂 Co-surfactant	Km	面积比 Area ratio/%
Tween 40	丙二醇	0.5	0.65
		1	1.86
		2	2.44
		3	0.61
		4	1.76

表 7 不同 S/O 与油相形成的纳米微乳液粒径、PDI 及 Zeta 电位
Tab. 7 Emulsion particle size, PDI and Zeta potential formed by different S/O and oil phases

S/O	粒径 Particle size/nm	PDI	Zeta 电位 Zeta potential/mV
9 : 1	16.75±0.06	0.240±0.003	-3.15±0.46
8 : 2	23.80±0.09	0.421±0.007	-2.15±0.12
7 : 3	40.59±0.54	0.351±0.005	-2.95±0.13
6 : 4	77.93±0.79	0.315±0.059	-3.24±0.21

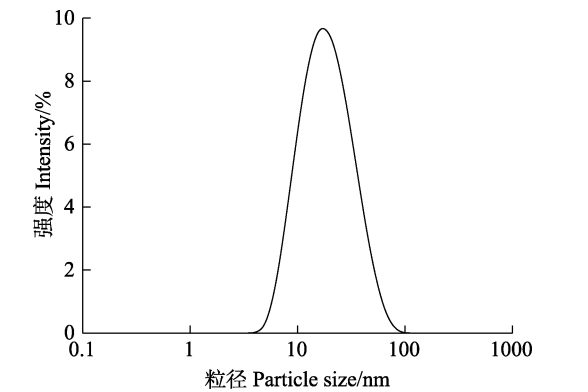


图 4 S/O 为 9 : 1 的粒径分布
Fig. 4 Particle size distribution with an S/O of 9 : 1

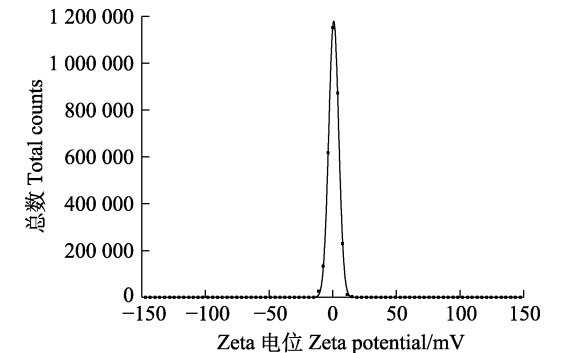


图 5 S/O 为 9 : 1 的 Zeta 电位分布
Fig. 5 Zeta potential profile with an S/O of 9 : 1

明制备的乳液粒径分布均匀稳定性较好。综上选择 S/O 为 9 : 1 进行纳米微乳液的制备。

2.5 纳米微乳液类型的鉴定

本研究采用染色法鉴定纳米微乳液的类型，该方法是根据相似相溶原理进行判断的，是一种比较直观且方便判断乳液类型的方法。结果表明，亚甲基蓝在乳液中的扩散速度明显快于苏丹Ⅳ（图 6），表明制备的纳米微乳液为 O/W 型。O/W 型纳米微乳液在不改变其结构的前提下能够被水无限稀释，因此 O/W 型纳米微乳液的应用价值比 W/O 更高。

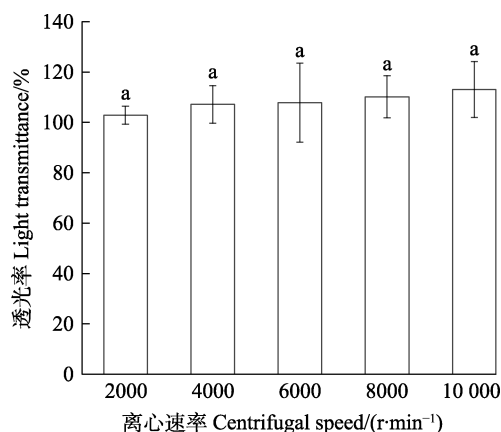


左：苏丹Ⅳ；右：亚甲基蓝。
Left: Sudan IV; Right: Methylene blue.
图 6 染色法鉴定纳米微乳液类型
Fig. 6 Dyeing method to identify emulsion types

2.6 纳米微乳液稳定性评价

稳定性评价是微乳体系质量特性中的重要部分，对微乳的应用范围、有效期及储存条件具有重要影响。考虑到纳米微乳液的应用范围和周期性，需要对其稳定性进行评价。本研究中对制备的香草兰纳米乳液主要从离心稳定性、热稳定性以及储藏稳定性 3 个方面进行考察，从而为其实际应用提供参考价值。

2.6.1 离心稳定性 评价纳米微乳液稳定性的传统方法是将纳米微乳液在一定条件下放置一段时间，观察其分层现象，但是此法耗时长。而利用离心机对纳米微乳液进行离心处理可以非常方便快捷地测定纳米微乳液的稳定性。通过测定乳液在 2000~10 000 r/min 条件下离心前后的吸光度变化来考察纳米微乳液体系的稳定性^[32-33]。结果表明，香草兰挥发油纳米微乳液在不同的离心速率条件下，依然保持澄清透明，均未出现分层现象，其透光率均在 100%以上，且在测试的离心条件下，制备的乳液透光率无显著性差异（图 7），表明离心过程中微乳的颗粒聚集程度非常低，表明制备的乳液具有较好的离心稳定性。

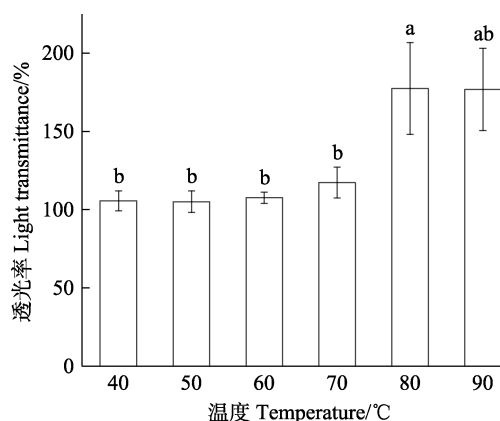


相同小写字母表示差异不显著 ($P > 0.05$)。
The same lowercase letters indicate no insignificant difference ($P > 0.05$).

图 7 不同离心速率下纳米微乳液的透光率

Fig. 7 Light transmittance of emulsion at different centrifugal speed

2.6.2 热稳定性 温度对吐温系列乳化剂的溶解度有重要影响, 因此有必要考察制备的纳米微乳液的热稳定性。通过测定乳液在不同温度下水浴加热前后的吸光度来反映乳液的热稳定性, 为其应用实际提供依据^[34]。乳液在不同水浴温度下的透光率如图 8 所示, 在 40~90 °C 范围内, 香草兰挥发油纳米微乳液均未出现浑浊或分层, 其透光率均在 100% 以上, 表明制备的乳液在测试温度范围内具有很好的稳定性。但是当温度超过 80 °C 后, 乳液的透光率显著提高, 与 40~70 °C 条件下乳液的透光率差异显著, 可能是由于表面活性剂在高温条件下促进了油水的进一步混合使乳液透光率提高。



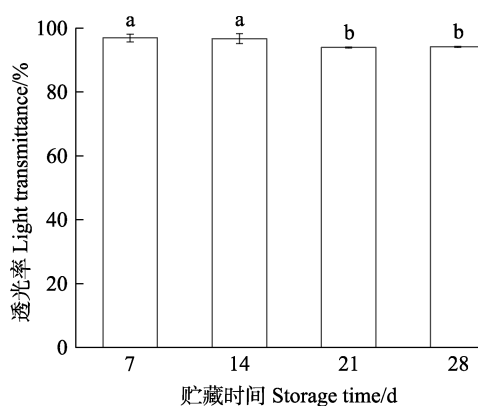
不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。
Different lowercase letters indicate insignificant difference ($P < 0.05$).

图 8 不同温度下纳米微乳液的透光率

Fig. 8 Light transmittance of emulsion at different temperatures

2.6.3 贮藏稳定性 纳米微乳液的稳定性与产品的最终质量密切相关, 而贮藏稳定性是考察乳液是否稳定的重要环节。新制备的纳米微乳液在体系中是均一的, 在贮藏过程中由于重力作用一般会出现分层或者乳析等现象。因此纳米微乳液的贮藏稳定性是评价纳米微乳液是否稳定的重要依据^[35]。

将所制备的乳液置于 4 °C 冰箱中贮藏 30 d, 乳液在不同贮藏时间的透光率如图 9 所示, 在整个贮藏过程中, 香草兰挥发油纳米微乳液均保持澄清透明, 未出现分层或浑浊现象。在 4 °C 贮藏条件下, 挥发油纳米微乳液的透光率均在 94% 以上, 说明香草兰挥发油纳米微乳液在 4 °C 低温条件下具有较好的稳定性。随着贮藏时间的延长, 乳液的透光率有所降低, 出现该情况的原因可能是 Tween 40 在低温条件下析出使乳液出现浑浊, 致使乳液的透光率降低。



不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。
Different lowercase letters indicate insignificant difference ($P < 0.05$).

图 9 不同贮藏时间下纳米微乳液的透光率

Fig. 9 Light transmittance of emulsion at different storage times

3 讨论

植物挥发油是芳香植物和药用植物的固有成分, 富含生物活性, 但是受挥发油的高疏水性, 在水介质中溶解度差及其高挥发性导致递送行为不受控制等限制, 挥发油的应用范围仍然很窄, 针对以上限制因素, 微乳技术可以提供相应解决方案以提高挥发油的稳定性和生物活性^[36-37]。在本研究中, 制备的香草兰乳液具有较好的离心稳定性、热稳定性以及贮藏稳定性, 提高了香草兰挥发油的稳定性, 有利于香草兰挥发油的进一步开发利用。微乳技术可应用于多种植物精油, 以

改善其稳定性和生物活性,尤其在改善天然香辛料精油的稳定性等方面应用广泛。如通过超声剪切制备肉桂精油纳米微乳液,在离心、冻融、加热-冷冻等条件下肉桂精油纳米微乳液均未出现分层、乳析等现象,粒径及PDI变化幅度较小,具有很好的稳定性^[38]。杨菲等^[39]制备的柳叶蜡梅精油乳液对热、pH具有良好的稳定性以及抗氧化活性,另外对大肠杆菌等食源性致病菌具有良好的抑菌活性,有助于柳叶蜡梅精油的进一步开发应用。将精油制成乳液不仅可改善精油稳定性和水溶性差的缺点,还可以拓展其应用范围,如张坤^[40]制备的薄荷精油乳液用于果树病虫害的防治,以乳液的形式进行应用解决了精油挥发性强导致的病虫害防治效果差的问题。目前,对不同来源的挥发油辅以表面活性剂、助表面活性剂构建乳化体系也可提高挥发油的稳定性,使挥发油的应用范围更广泛。

纳米乳液作为一种递送系统,在营养物质的运输方面具有一定的优势,但是也存在一定的安全问题。表面活性剂作为纳米乳液的基本组成成分之一,其主要作用是降低油水界面的张力,而表面活性剂在两相界面之间存在吸附和解吸附的动态平衡过程,加之纳米乳液的粒径较小意味着比表面积较大,因而制备纳米乳液需要使用较多的表面活性剂^[41-42]。虽然表面活性剂应用普遍,但是也存在一定潜在危害。过量的表面活性剂会造成体系不稳定并降低生物活性,JIMENEZ-ESCOBA等^[43]在制备类胡萝卜素纳米乳液时,研究了表面活性剂对小鼠肝脏的影响,结果表明Tween 40能够促进丙氨酸氨基转移酶和天冬氨酸转移酶等生物标志物的增加从而对小鼠的肝脏造成损伤。KERWIN^[44]通过研究认为,Tween 20和Tween 80可以发生自氧化和水解,导致酸和氢过氧化物的形成,将其用于生物制药产品中可能容易产生氧化应激的易感性。Tween系列表面活性剂对人类健康存在一定危害,而天然表面活性剂,如大豆卵磷脂等在一定程度上可以代替人工合成的表面活性剂,但是其乳化能力低于人工合成的表面活性剂,同时目前制备纳米乳液还无法完全摒弃人工合成的表面活性剂,这将为乳液的制备以及安全性带来一定挑战。

本研究通过绘制伪三元相图考察活性剂对香草兰挥发油乳液形成的影响,制备了香草兰挥发油纳米微乳液,通过微乳技术提高了香草兰挥发

油的稳定性,解决了香草兰挥发油水溶性差、利用率低等方面的问题,扩大了香草兰挥发油在食品领域的应用范围。但是,本研究仅对制备的香草兰挥发油纳米微乳液的稳定性进行了研究,今后应对其他生物活性,如抗氧化、抗菌等活性进行重点研究。

4 结论

本研究通过将香草兰挥发油制备成纳米微乳液,并对香草兰挥发油纳米微乳液进行表征及稳定性评价,结果表明,香草兰挥发油纳米微乳液最佳组成为Tween 40、丙二醇,Tween 40与丙二醇的质量比为2,混合表面活性剂与油相的质量比为9:1,可得到O/W型香草兰挥发油纳米微乳液,纳米微乳液的粒径为 $(16.75\pm 0.06)\text{nm}$,聚合物分散系数(PDI)为 0.240 ± 0.003 ,Zeta电位为 $(-3.15\pm 0.46)\text{V}$ 。制备的香草兰挥发油纳米微乳液在离心、加热以及4℃低温条件下具有良好的稳定性。本研究初步测定了制备的香草兰挥发油乳液的表征及稳定性,在后续研究中可通过对制备的香草兰挥发油乳液进行更系统的结构和性质测定,以期进一步扩大其应用范围。另外在乳液中还可以添加一些功能性物质,以扩大或者改善乳液的生物活性,制备更加实用的纳米乳液。

参考文献

- [1] AHMAD H, KHERA R A, HANIF M A, AYUB M A, JILANI M I. Chapter 48-Vanilla[M]. Medicinal Plants of South Asia, Elsevier, 2020: 657-669.
 - [2] FERRARA L. Medicinal and pharmaceutical properties of *Vanilla planifolia*[J]. International Journal of Medical Reviews, 2020, 7(1): 25-29.
 - [3] BAQUEIRO-PEÑA I, GUERRERO-BELTRÁN J Á. Vanilla (*Vanilla planifolia* Andr.), its residues and other industrial by-products for recovering high value flavor molecules: a review[J]. Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants, 2017, 6: 1-9.
 - [4] ANURADHA K, SHYAMALA B N, NAIDU M M. Vanilla-its science of cultivation, curing, chemistry, and nutraceutical properties[J]. Critical Reviews in Food Science Nutrition, 2013, 53(12): 1250-1276.
 - [5] 朱红梅, 张彦军, 徐飞, 田建文, 初众. 4种物理方法制备香草兰精油微胶囊的比较分析[J]. 食品科学, 2017, 38(21): 106-111.
- ZHU H M, ZHANG Y J, XU F, TIAN J W, CHU Z. Com-

- parative analysis of vanilla essence oil microcapsules prepared by four physical methods[J]. Food Science, 2017, 38(21): 106-111. (in Chinese)
- [6] 尚方剑. 抗枯萎病种香草兰根际微生态特征研究[D]. 海口: 海南大学, 2021.
SHANG F J. Study on rhizosphere microecological characteristics of *Fusarium* wilt disease-resistant vanilla[D]. Haikou: Hainan University, 2021. (in Chinese)
- [7] 王洁, 王蓓蓓, 尚方剑, 苏兰茜, 赵少官, 洪珊, 赵青云. 香草兰酚酸类自毒物质降解菌的筛选和鉴定及其抑菌效果[J]. 热带生物学报, 2018, 13(6): 595-604.
WANG J, WANG B B, SHANG F J, SU L Q, ZHAO S G, HONG S, ZHAO Q Y. Screening and identification of vanillinol acid self-toxic substances degrading bacteria and its antibacterial effect[J]. Journal of Tropical Biology, 2018, 13(6): 595-604. (in Chinese)
- [8] 石俊杰. 百里香精油微乳的制备及结合 1-MCP 在枇杷保鲜中应用[D]. 天津: 天津商业大学, 2023.
SHI J J. Preparation of thyme essential oil microemulsion and application of combined 1-methylcyclopropene in the preservation of loquat[D]. Tianjin: Tianjin University of Commerce, 2023. (in Chinese)
- [9] CHITTASUPHO C, DITSRI S, SINGH S, KANLAYAVATTANAKUL M, DUANGNIN N, RUKSIRIWANICH W, ATHIKOMKULCHAI S. Ultraviolet radiation protective and anti-inflammatory effects of kaempferia galanga l. rhizome oil and microemulsion: formulation, characterization, and hydrogel preparation[J]. Gels, 2022, 8(10): 639.
- [10] KALE S N, DEORE S L. Emulsion micro emulsion and nano emulsion: a review[J]. Systematic Reviews in Pharmacy, 2016, 8(1): 39-47.
- [11] SHI W, YAN R, HUANG L. Preparation and insecticidal performance of sustained-release cinnamon essential oil microemulsion[J]. The Science of Food and Agriculture, 2022, 102(4): 1397-1404.
- [12] ALMASI L, RADI M, AMIRI S. The release rate and antimicrobial activity of calcium-alginate films containing self-microemulsifying *Thymus vulgaris* essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*[J]. Journal of Food Safety, 2020, 40(5): e12828.
- [13] CHEN Y, ZHANG H Y, YANG J, SUN H Y. Improved antioxidant capacity of optimization of a self-microemulsifying drug delivery system for resveratrol[J]. Molecules, 2015, 20(12): 21167-21177.
- [14] EMTIAZI H, SALARI SHARIF A, HEMATI M, FATEMEH HAGHIRALSADAT B, PARDAKHTI A. Comparative study of nano-liposome and nano-niosome for delivery of *Achillea millefolium* essential oils: development, optimization, characterization and their cytotoxicity effects on cancer cell lines and antibacterial activity[J]. Chemistry & Biodiversity, 2022, 19(10): e202200397.
- [15] 余立意, 张辉, 冯凤琴. 食品级微乳液的研究进展[J]. 食品工业科技, 2012, 33(11): 391-394, 399.
YU L Y, ZHANG H, FENG F Q. Research progress in food-grade microemulsions[J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(11): 391-394, 399. (in Chinese)
- [16] MCCLEMENTS D J. Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance[J]. Soft Matter, 2011, 7(6): 2297-2316.
- [17] 张昭. 基于百里香精油纳米微乳液层层自组装微胶囊的淀粉基薄膜的抗菌保鲜应用[D]. 武汉: 华中农业大学, 2019.
ZHANG Z. Application on antiseptic preservation of starch films with thyme essential oil microemulsion and layer-by-layer self-assembly microcapsule[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2019. (in Chinese)
- [18] 汤友军. 柑橘精油微乳体系构建及其对杏保鲜品质的研究[D]. 天津: 天津商业大学, 2020.
TANG Y J. Construction of citrus essential oil microemulsion system and research on its preservation quality of apricot[D]. Tianjin: Tianjin University of Commerce, 2020. (in Chinese)
- [19] 墙梦捷. 艾叶精油微乳的制备及对樱桃保鲜效果的影响[D]. 天津: 天津商业大学, 2021.
QIANG M J. Preparation of microemulsion of *Artemisia* leaves essential oil and its effect on freshness preservation of cherry[D]. Tianjin: Tianjin University of Commerce, 2021. (in Chinese)
- [20] 褚祚晨. 草豆蔻精油微乳液的制备及对香蕉保鲜的影响[D]. 武汉: 华中农业大学, 2023.
CHU Z C. Preparation of microemulsion of grass cardamom essential oil and its effect on the preservation of banana freshness[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2023. (in Chinese)
- [21] 石俊杰, 鲁晓翔. 植物精油微乳技术及在食品保鲜中的应用[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(6): 267-273.
SHI J J, LU X X. Microemulsion technology of plant essential oil and its application in food preservation[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(6): 267-273. (in Chinese)
- [22] 樊志国. 胡椒叶精油低共熔溶剂辅助提取、微乳制备及生物活性研究[D]. 海口: 海南大学, 2020.
FAN Z G. Study on deep eutectic solvent-assisted extraction, microemulsion preparation and biological activity of pepper leaves essential oil[D]. Haikou: Hainan University, 2020. (in Chinese)
- [23] 丁佩章. 表面活性剂及其 HLB 值[J]. 滨州师专学报, 1994(2): 17-20.
DING P Z. Surfactants and its HLB values[J]. Binzhou Teachers College, 1994(2): 17-20. (in Chinese)

- [24] 张坤玲, 李瑞珍, 卢玉妹, 尚平. HLB 值与乳化剂的选择[J]. 石家庄职业技术学院学报, 2004(6): 20-22.
ZHANG K L, LI R Z, LU Y M, SHANG P. Selection of emulphor according to HLB[J]. Shijiazhuang Vocational Technology Institute, 2004(6): 20-22. (in Chinese)
- [25] PAVONI L, PERINELLI D R, BONACUCINA G, CESPI M, PALMIERI G F. An overview of micro-and nanoemulsions as vehicles for essential oils: formulation, preparation and stability[J]. Nanomaterials, 2020, 10(1): 135.
- [26] 丁皓迪, 蒋志国. 胡椒叶精油微乳液的构建及其抗氧化活性分析[J]. 中国食品添加剂, 2021, 32(2): 6-13.
DING H D, JIANG Z G. Preparation of microemulsion of pepper leaves essential oil and analysis of antioxidant activity[J]. China Food Additives, 2021, 32(2): 6-13. (in Chinese)
- [27] TROTTA M, CAVALLI R, UGAZIO E, GASCO M R. Phase behaviour of microemulsion systems containing lecithin and lysolecithin as surfactants[J]. International Journal of Pharmaceutics, 1996, 143(1): 67-73.
- [28] 崔绮嫦, 吴克刚, 莫谔弛, 段雪娟. 溶剂和微乳化的稀释效应对食用植物油抗菌活性的影响[J]. 中国食品学报, 2020, 20(3): 195-203.
CUI Q C, WU K G, MO R C, DUAN X J. Dilution effect of solvent and micro emulsification on the antibacterial activity of plant essential oils[J]. Chinese Institute of Food Science and Technology, 2020, 20(3): 195-203. (in Chinese)
- [29] 墙梦捷, 鲁晓翔. 艾叶精油微乳的表征及稳定性研究[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(23): 86-91.
QIANG M J, LU X X. Study on the characterization and stability of Argyi leaf essential oil microemulsion[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(23): 86-91. (in Chinese)
- [30] 曹发昊. 苦参碱微乳的研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2007.
CAO F H. Study of matrine microemulsions[D]. Yangling: Northwest A & F University, 2007. (in Chinese)
- [31] 黄欢, 田燕, 刘一哲, 白新鹏. 椰子油纳米乳液制备工艺优化及其稳定性分析[J]. 食品工业科技, 2023, 44(9): 10-19.
HUANG H, TIAN Y, LIU Y Z, BAI X P. Optimization of preparation technology and stability analysis of coconut oil nanoemulsion[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(9): 10-19. (in Chinese)
- [32] 姬书亮, 黄玲. 艾蒿油乳液稳定性的油相离心系数法表征[J]. 印染助剂, 2012, 29(7): 19-22.
JI S L, HUANG L. Characterization of the stability of artemisia oil emulsion with oil-phase centrifugal coefficient[J]. Exitle Printing and Dying Additive, 2012, 29(7): 19-22. (in Chinese)
- [33] 刘欣. 玫瑰精油微乳液制备及特性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2017.
LIU X. Preparation and characterization of rose oil microemulsion[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2017. (in Chinese)
- [34] 崔钰涵. 丁香精油微乳制备及其复合壳聚糖对芒果保鲜效果的研究[D]. 天津: 天津商业大学, 2021.
CUI Y H. Study on the preparation of clove essential oil microemulsion and the preservation effect of compound chitosan on mango[D]. Tianjin: Tianjin University of Commerce, 2021. (in Chinese)
- [35] 黎静斌. 肉桂精油乳液的制备及其对南丰蜜桔保鲜效果的研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2023.
LI J B. Preparation of cinnamon essential oil emulsion and its effect on preservation of Nanfeng tangerine[D]. Nanchang: Nanchang University, 2023. (in Chinese)
- [36] AMIRI-RIGI A, ABBASI S, EMMAMBUX M N. Background, limitations, and future perspectives in food grade microemulsions and nanoemulsions[J]. Food Reviews International, 2022, 39: 5048-5086.
- [37] SINGH I R, PULIKKAL A K. Preparation, stability and biological activity of essential oil-based nano emulsions: a comprehensive review[J]. OpenNano, 2022, 8: 100066.
- [38] LIANG D, WANG C, LUO X, WANG Z, KONG F, BI Y. Preparation, characterization and properties of cinnamon essential oil nano-emulsion formed by different emulsifiers[J]. Drug Delivery Science and Technology, 2023, 86: 104638.
- [39] 杨菲, 邱珊莲, 刘伟. 柳叶蜡梅精油纳米乳液的制备及其性质研究[J]. 粮食与油脂, 2024, 37(7): 24-29.
YANG F, QIU S L, LIU W. Study on preparation and properties of *Chimonanthus salicifolius* essential oil nano-emulsion[J]. Cereals & Oils, 2024, 37(7): 24-29. (in Chinese)
- [40] 张坤. 薄荷精油纳米乳液的制备、特性表征及其应用研究[D]. 太原: 山西农业大学, 2023.
ZHANG K. Preparation, characterization and application study of peppermint essential oil nanoemulsions[D]. Taiyuan: Shanxi Agriculture University, 2023. (in Chinese)
- [41] 黄文清, 马娟娟. 纳米乳液在食品领域的研究应用进展[J]. 中国食品添加剂, 2024, 35(4): 327-335.
HUANG W Q, MA J J. Research and application progress of nano-emulsion in food field[J]. China Food Additives, 2024, 35(4): 327-335. (in Chinese)
- [42] AZEEM A, RIZWAN M, AHMAD F J, IQBAL Z, KHAR R K, AQIL M, TALEGAONKAR S. Nanoemulsion components screening and selection: a technical note[J]. AAPS Pharm SciTech, 2009, 10(1): 69-76.
- [43] JIMENEZ-ESCOBAR M P, PASCUAL-MATHEY L I, BERISTAIN C I, FLORES-ANDRADE E, JIMÉNEZ M, PASCUAL-PINEDA L A. *In vitro* and *in vivo* antioxidant properties of paprika carotenoids nanoemulsions[J]. LWT-Food Science and Technology, 2020, 118: 108694.
- [44] KERWIN B A. Polysorbates 20 and 80 used in the formulation of protein biotherapeutics: structure and degradation pathways[J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2008, 97(8): 2924-2935.