

## 香草兰精油 Pickering 乳液制备、性质及功能性研究

王艺潼<sup>1,2,3,4</sup>, 覃亚娟<sup>1,2,3,4</sup>, 徐飞<sup>1,3,4</sup>, 张彦军<sup>1,3,4\*</sup>, 王萍<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> 中国热带农业科学院香料饮料研究所 海南万宁 571533

<sup>2</sup> 东北林业大学生命学院 哈尔滨 150040

<sup>3</sup> 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

<sup>4</sup> 海南省热带香料饮料作物工程技术研究中心 海南万宁 571533)

**摘要** 为对植物精油进行有效保护,控制其缓慢释放并扩大其应用范围,以香草兰精油为原料,通过剪切超声技术制备以辛烯基琥珀酸淀粉(OSA 淀粉)为固体颗粒的 Pickering 乳液,测定其在贮藏期间的稳定性及香气释放速率,探究乳液消化过程中的变化,并对精油及乳液的抗炎性和 MCF-7 细胞抗增殖性进行对比。结果表明,香草兰精油 Pickering 乳液液滴表面光滑,颗粒完整,最小粒径为 0.54  $\mu\text{m}$ 。Pickering 乳液可有效提高精油贮藏稳定性。与香草兰精油相比,乳液有效降低内部精油的香气释放率约 100 倍。Pickering 乳液具有显著的抗消化能力,游离脂肪酸释放率在 120 min 内达到 22.35%。香草兰精油制备 Pickering 乳液后依旧保持较高的抗炎活性,与未经处理的 MCF-7 细胞相比,二者均具有较强抗增殖作用。结论:用 OSA 淀粉稳定香草兰精油制备的 Pickering 乳液可有效增加精油溶解度,提高稳定性,扩大应用范围。本试验可为香草兰精油的应用,特别是功能性物质的应用提供理论依据。

**关键词** 香草兰精油; Pickering 乳液; 抗炎活性; MCF-7 抑制

**文章编号** 1009-7848(2024)05-0233-12 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.05.019

香草兰【*Vanilla fragrans* (Salisb.) Ames】,又称香荚兰、香子兰、香果兰等,是兰科(Orchidaceae)香子兰属(*Vanilla*)植物,原产于墨西哥东南部和中美洲的雨林中,素有“食品香料之王”的称号<sup>[1]</sup>。图 1a 为新鲜香草兰豆荚,图 1b 为发酵后香草兰豆荚。发酵后的香草兰豆荚所含香草兰精油含量并不高,占干重的 4%~7%,由于香草兰精油中含有大量的挥发性和非挥发性物质,因此添加少量即有浓郁香气<sup>[2]</sup>。香草兰精油中的酚类以及萜类等天然活性物质具有良好的挥发性并易被人体吸收,拥有抗氧化和抗菌等多种功能<sup>[1-2]</sup>。

植物精油因丰富的功效而被广泛应用在医学、日化及食品行业。然而,其有效成分挥发性大,溶解度低,在空气、光 and 高温下容易降解<sup>[3]</sup>,造成精油的芳香味挥发较快,不易加工及运输,释放不可

控制,亟需寻找一种手段保护精油并克服这些缺点。Pickering 乳液因独特的稳定性,与传统乳液相比毒性较小等优点而受到广泛应用<sup>[4]</sup>。Pickering 乳液作为一种利用天然生物大分子代替传统乳化剂稳定油-水界面所制备的乳液,具有众多优点:绿色安全无毒,材料保护好,稳定性较传统乳液高且成本低廉。同时被包覆的精油与外界隔绝,因此可以免受氧气、光照等影响,在适当的条件下,通过外部刺激或缓释作用将精油释放出来而发挥功能,这一特性使 Pickering 乳液多应用于功能性研究中。Sintès 等<sup>[5]</sup>将聚乳酸-羟基乙酸共聚物作为颗粒乳化剂制备 Pickering 乳液,稳定免疫抑制剂药物环孢菌素 A 和他克莫司,并对其抗炎及免疫特性进行研究,结果表明,所制备的 Pickering 乳液在体外以及皮肤外植体上均对免疫 T 细胞核质形成细胞能力具有影响。同时将他克莫司 Pickering 乳液作用于人永生化角质皮层细胞(Ha-CaT),观察到 IL-8 产量明显降低 35%,说明 Pickering 乳液对炎性皮肤病具有新的治疗效果。Low 等<sup>[6]</sup>以纤维素纳米晶为颗粒稳定剂制备 Pickering 乳液,稳定负载姜黄素的玉米油,发现其对入结肠癌细胞 HCT116 的抑制作用显著。相比于上述固

**收稿日期:** 2023-05-28

**基金项目:** 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(1630142022007,1630142022008);海南省科技人才创新项目(KJRC2023C28);国家热带农业科学中心科技创新团队(CATASCXTD202304)

**第一作者:** 王艺潼,女,硕士生

**通信作者:** 张彦军 E-mail: zhangyanjun0305@163.com  
王萍 E-mail: wangping2178@nefu.edu.cn

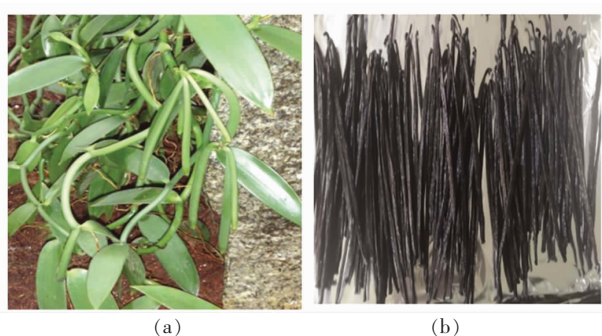


图1 新鲜香草兰豆荚(a)和发酵后香草兰豆荚(b)

Fig.1 Fresh vanilla pods (a) and fermented vanilla pods (b)

体颗粒稳定剂, 辛烯基琥珀酸淀粉酯 (Octenyl succinateanhydrate starch, 简称“OSA 淀粉”)现阶段应用范围较广, 通过酯化反应增加天然淀粉的疏水作用, 进而更好地吸附于油-水界面, 提高乳液界面稳定性和贮藏稳定性, 控制精油释放速度, 也可以掩盖强烈的气味<sup>[7]</sup>, 拓宽乳液作为功能性营养成分运输体系或食品功能制剂的应用前景<sup>[8]</sup>。

本研究选取香草兰精油为原料, 以 OSA 淀粉为固体颗粒稳定剂, 制备 Pickering 乳液。通过光学显微镜观察乳液液滴形态, 探究 Pickering 乳液的贮藏稳定性以及香气释放速率的变化。对乳液进入消化道后的微观结构进行观察, 以透明质酸酶抑制和牛血清白蛋白变性作为指标对比制备的 Pickering 乳液与精油的体外抗炎活性, 以人乳腺癌细胞 MCF-7 抗增值率为指标, 探究香草兰精油和 Pickering 乳液的抗癌活性, 以期对香草兰的开发与利用提供新思路, 为香草兰精油功能性应用提供理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

香草兰精油, 实验室超临界 CO<sub>2</sub> 提取;  $\alpha$ -淀粉酶、胃蛋白酶、胰脂肪酶, 透明质酸酶、透明质酸钠、牛血清白蛋白 (BSA), 源叶生物科技有限公司; MCF-7 细胞, 中国科学院上海细胞库, 其它试剂均为分析纯级。

### 1.2 仪器与设备

MasterSizer 3000 型粒径分析仪, 英国 Malvern 公司; UV-2700 型紫外-可见分光光度计,

苏州岛津公司; HR50-IIA2 型生物安全柜, 中国青岛海尔公司; DNP-9162BS-III 型电热恒温保温箱, 上海新苗医疗器械制造有限公司; Alpha MOS Gemini 电子鼻分析仪, AlphaMOS 公司; Phenom Prox 台式显微能谱一体机, 荷兰 Phenom 公司。

### 1.3 试验方法

1.3.1 香草兰精油 Pickering 乳液制备工艺 根据前期试验结果<sup>[9]</sup>, 确定香草兰精油 Pickering 乳液制备方法如下: 准确称取一定质量 OSA 淀粉, 按质量体积比加入去离子水 (3 g 淀粉加入到 100 mL 去离子水中), 在 85 °C 下充分搅拌 30 min, 冷却降温至 50 °C, 配制 3% 的淀粉溶液。取 5% 的香草兰精油, 逐滴加入淀粉溶液中, 使最终体积为 10 mL。在相同温度下, 利用高速剪切搅拌机搅拌 3 min, 在转速为 10 000 r/min 条件下制备初乳液。在 450 W 超声功率条件下, 超声 3 min 再次超声分散, 得到香草兰精油 Pickering 乳液。

#### 1.3.2 乳液形态观察

1.3.2.1 光学显微镜观察 使用光学显微镜观察乳液微观形态。取 10  $\mu$ L 乳液滴至载玻片, 盖上盖玻片后, 使用正立荧光显微镜放大 100 倍后进行观察。

1.3.2.2 扫描电镜观察 将 Pickering 乳液冷冻干燥后制成粉末, 通过扫描电镜观察液滴表面形态。将干燥后的粉末固定在具有双面胶的金属棒上, 经 10 kV 加速电压喷金后观察。

#### 1.3.3 乳液稳定性测定

1.3.3.1 贮藏稳定性的测定 为测定所制备 Pickering 乳液的贮藏稳定性, 将乳液在室温下放置 21 d。将试管用锡纸包住置于暗处, 分别在 1, 3, 5, 7, 14, 21 d 进行粒径测定, 用于表征乳液的贮藏稳定性。

1.3.3.2 电子鼻缓释性的测定 样品贮藏于常温常压下, 通过电子鼻测定贮藏过程中香草兰精油及其乳液香气强度的变化趋势。试验参照文献<sup>[10]</sup>所描述方法进行测定。检测条件: 载气为流速 150 mL/min 的纯净空气; 样品量为 50  $\mu$ L, 加热至 50 °C 持续 300 s; 1 500  $\mu$ L 进样量, 升高温度为 60 °C。每个样品均进行 5 次平行试验。

#### 1.3.4 Pickering 乳液体外消化模拟

##### 1.3.4.1 模拟液的制备

1) 模拟唾液 模拟唾液为 100 mL, 其中  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  质量浓度为 0.55 g/L,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  质量浓度为 0.27 g/L,  $\alpha$ -淀粉酶活力为 1 500 U/mL,  $\text{CaCl}_2$  浓度为 0.3 mol/L, 使用 1 mol/L HCl 调节 pH 值为 7.0。

2) 模拟胃液 胃液为 50 mL, 其中 NaCl 的质量浓度为 2 g/L, 胃蛋白酶质量浓度为 3.2 g/L, 使用 1 mol/L HCl 调节 pH 值为 1.2。

3) 模拟小肠液 小肠液为 50 mL, 其中胆盐质量浓度为 48.5 mg/mL, 胰脂肪酶质量浓度为 12 mg/mL,  $\text{CaCl}_2$  溶液为 0.75 mol/L, 调节 pH 值为 7.0。

### 1.3.4.2 体外消化试验

1) 口腔阶段 将 5 mL 模拟唾液放置于 37 °C 水浴预热, 然后与乳液进行混合, 放置于 100 r/min、37 °C 的水浴锅中振荡 2 min。

2) 胃阶段 取 5 mL 来自口腔的样品, 与 15 mL 模拟胃液混合, 使用 1 mol/L HCl 将 pH 值稳定至 1.2, 之后置于 100 r/min、37 °C 的恒温水浴锅中振荡 2 h。

3) 小肠阶段 胃消化后混合液至室温后, 使用 0.1 mol/L NaOH 调 pH 值至 7.0, 在 100 r/min、37 °C 水浴锅中振荡 2 h 进行肠道消化。取上述胃消化液 10 mL 加入相同体积模拟肠液, 充分混匀后, 调节 pH 值为 7.0。在小肠消化的 2 h 中, 不断加入 0.2 mol/L NaOH 维持 pH 值为 7.0, 并随着时间推移记录消耗的 NaOH 的体积, 按式(1)换算为游离脂肪酸(FFA)释放量。

$$\text{FFA}(\%) = \frac{c_{\text{NaOH}} \times V_{\text{NaOH}}}{2M_{\text{oil}}} \times 100 \quad (1)$$

式中,  $c_{\text{NaOH}}$ ——滴定时 NaOH 溶液的浓度, mol/L;  $V_{\text{NaOH}}$ ——消化 2 h 所消耗的 NaOH 溶液的体积, L;  $M_{\text{oil}}$ ——油相平均分子质量, g/mol。

FFA 的释放速率是通过在消化过程中拟合线性曲线来估计的。Pickering 乳液的一级释放动力学模拟方程, 如式(2)所示。

$$M_t = M_0(1 - e^{-kt}) \quad (2)$$

式中,  $t$ ——乳剂在小肠中的停留时间, min;  $M_t$ —— $t$  时间内的累计释放量;  $M_0$ ——FFA 的初始释放;  $k$ ——一级动力学反应速率常数。

### 1.3.5 抗炎活性的测定

1.3.5.1 透明质酸酶抑制作用的测定 参照 Aissa 等<sup>[11]</sup>方法, 略作改动。A 和 C 组中加入 0.5 mL 含有透明质酸酶溶解在醋酸盐的缓冲液。B 和 D 组中加入 0.5 mL pH 4.0 的醋酸盐溶液(1 mol/L)作为空白对照组。分别加入 0.1 mol/L  $\text{CaCl}_2$  后, 样品在 40 °C 孵育 20 min。在上述样品中分别加入 0.5 mL 透明质酸钠溶液于 40 °C 孵育 20 min, 加入 0.1 mL 0.4 mol/L 氢氧化钠和 0.2 mL 硼酸溶液后冰浴 15 min 再加热 5 min 再冰浴 3 min, 最后加入 3 mL 显色剂 P-DAB, 在波长 585 nm 处测量吸光度。用双氯芬酸钠作为阳性对照。根据式(3)计算透明质酸酶抑制率。

$$\text{抑制率}(\%) = \left[ 1 - \frac{(\text{Abs}_C - \text{Abs}_D)}{(\text{Abs}_A - \text{Abs}_B)} \right] \times 100 \quad (3)$$

式中,  $\text{Abs}_A$ ——透明质酸酶+精油/乳液组在波长 585 nm 处的吸光度;  $\text{Abs}_B$ ——无透明质酸酶+精油/乳液组在波长 585 nm 处的吸光度;  $\text{Abs}_C$ ——透明质酸酶+精油/乳液空白组在波长 585 nm 处的吸光度;  $\text{Abs}_D$ ——无透明质酸酶+精油/乳液空白组在波长 585 nm 处的吸光度。

1.3.5.2 牛血清白蛋白变性抑制作用的测定 参照 Costa 等<sup>[12]</sup>的方法, 略作修改。在含有 450  $\mu\text{L}$  0.5 g/100 mL BSA 的试验组(A)中加入 50  $\mu\text{L}$  不同质量浓度样品。设置试验对照组(B)、空白对照组(C)和阳性对照组。使用 1 mol/L HCl 将所有上述溶液的 pH 值调节至 6.0。样品在 37 °C 下放置 20 min, 升高温度使样品在 70 °C 下保持 10 min。加入 3 mL PBS, 并使用分光光度计在波长 660 nm 处测量吸光度, 根据式(4)计算牛血清白蛋白变性抑制率。

$$\text{抑制率}(\%) = \left[ 100 - \frac{(\text{Abs}_A - \text{Abs}_B)}{\text{Abs}_C} \right] \times 100 \quad (4)$$

式中,  $\text{Abs}_A$ ——精油/乳液组在波长 660 nm 处的吸光度;  $\text{Abs}_B$ ——精油/乳液对照组在波长 660 nm 处的吸光度;  $\text{Abs}_C$ ——空白对照组在波长 660 nm 处的吸光度。

### 1.3.6 MCF-7 抑制作用的测定

1.3.6.1 MCF-7 细胞存活率的测定 使用 MTT 法<sup>[13]</sup>检测 MCF-7 细胞存活率。调整细胞浓度至  $5 \times 10^4$  个/孔, 以每孔 100  $\mu\text{L}$  接种量接种于 96 孔板中, 于 37 °C、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 24 h。加入用

完全培养液稀释好的不同质量浓度精油及 Pickering 乳液,继续培养 24 h。加入 10  $\mu\text{L}$  质量浓度为 0.5 mg/mL 的 MTT 试剂,继续培养 4 h。取出培养板,移去培养液和 MTT 溶液,每孔加入 150  $\mu\text{L}$  DMSO 溶液振荡 10 min,在波长 490 nm 处测定吸光值。各样品孔记为试验组,未经处理孔作为对照组,并将对照组细胞的存活率设定为 100%。用式(5)计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率}(\%) = \frac{\text{OD}_{\text{试验组}}}{\text{OD}_{\text{对照组}}} \times 100 \quad (5)$$

1.3.6.2 MCF-7 细胞凋亡率的测定 参考文献[14]的方法,利用流式细胞仪测定人乳腺癌细胞 MCF-7 细胞凋亡率。离心收集悬浮细胞(离心机转速约为  $300 \times g$ ,温度  $2 \sim 8 \text{ }^\circ\text{C}$ ,离心时间 5 min,弃培养基),用冷 PBS 清洗细胞 2 次,使用 400  $\mu\text{L}$  1 $\times$  磷脂结合蛋白(Annexin V)结合液重新悬浮细胞至浓度为  $10^6$  个/mL。将细胞悬浮液置于孔板后,待细胞贴壁形成后分别加入不同质量浓度精油及 Pickering 乳液,同时设置空白对照组。培养 24 h 之后,用胰蛋白酶消化,1 000 r/min 离心 5 min 后

收集细胞。将细胞悬浮液加入 5  $\mu\text{L}$  Annexin V-FTIC 染色剂,轻轻混匀后于  $2 \sim 8 \text{ }^\circ\text{C}$  避光条件下培养 15 min。加入 5 $\sim$ 10  $\mu\text{L}$  碘化丙啶(PI)染色液轻摇混匀后于  $2 \sim 8 \text{ }^\circ\text{C}$  避光条件下培养 2 $\sim$ 5 min,立即用流式细胞仪测定 MCF-7 细胞凋亡率。

1.3.7 数据处理与统计分析 每个试验组进行 3 次平行试验,试验结果表示为  $(\bar{x} \pm s)$ 。采用 Excel、Origin 8.5、SPSS 20.0 进行数据处理、图表制作以及数据分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 乳液形态观察

显微镜下观察 Pickering 乳液呈现圆形并相互聚集,密度较大且尺寸小,平均粒径  $D_{[4,3]}$  为  $(0.54 \pm 0.01) \mu\text{m}$ 。李迪<sup>[15]</sup>观察到相似现象,可能是由于液滴表面张力减小,三维网络构建能力减弱,导致液滴增大聚集。在扫描电镜下观察同样可以明显看出乳液液滴少量相互聚集且形状规则(图 2c 和 2d)。单一液滴颗粒呈球形,表现较为光滑,略微出现的褶皱是由于 OSA 淀粉属于改性淀粉,

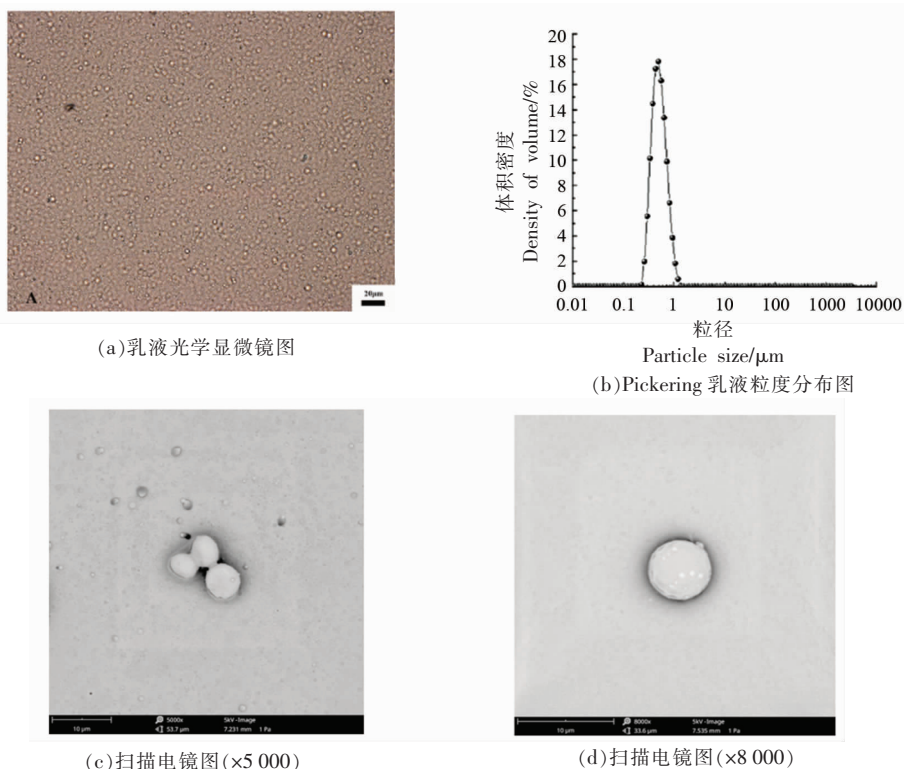


图 2 香草兰精油 Pickering 乳液光学显微镜图(a)、粒度分布图(b)及扫描电镜图(c、d)

Fig.2 Optical microscope of vanilla essential oil Pickering emulsions (a), particle size distribution (b) and SEM microstructure (c, d)

包裹精油形成液滴后失去原有平滑表面。液滴表面并未出现破损,说明 OSA 淀粉具有较好的包裹精油的能力。

## 2.2 乳液稳定性

**2.2.1 贮藏稳定性** 如图 3a 所示,随着贮藏时间的增加,乳液粒径保持随淀粉质量浓度增加粒径减小的趋势。前 7 d 内,3.0 mg/mL 淀粉质量浓度下乳液的粒径没有明显增加,粒径保持最小为 0.53  $\mu\text{m}$ 。这是由于油滴外表面的固体颗粒紧密排列,颗粒尺寸随着贮藏时间的延长而略有增加。乳液的粒径在 7~21 d 内增加约 0.49  $\mu\text{m}$ ,乳液体系的外观没有出现分层。该现象产生的原因可能是小液滴出现聚集状态,相互融合形成大液滴<sup>[6]</sup>,说明体系内部较为稳定;同时,由于 Ostwald 成熟机理:即较小的液滴逐渐聚集增大为较大液滴,直至小液滴消失的过程,这解释了乳液粒径增大现象。

本试验中,乳液粒径在 14d 后呈现平稳变化趋势,且乳液并未出现分层,说明 Pickering 乳液稳定。

图 4b 所示为不同体积分数香草兰精油制备的 Pickering 乳液 21 d 贮藏过程中粒径的变化。随着贮藏时间的增加,乳液粒径呈现逐渐增大趋势。在香草兰精油体积分数为 10%,21 d 时具有最大粒径为 1.58  $\mu\text{m}$ 。当精油体积分数为 5% 时,乳液在前 7 d 均保持稳定且粒径变化不明显,这是由于质量浓度为 3.0 mg/mL 的淀粉溶液可以完全包裹住油滴,颗粒之间紧密衔接,将精油分散包裹成小液滴;而 7 d 后的乳液粒径突然增大,是由于淀粉颗粒与颗粒之间的相互碰撞增加了液滴聚集的可能,淀粉分子之间的相互作用也可以吸引液滴相互聚集,造成乳液粒径增大<sup>[7]</sup>,这也是不同精油体积分数制备的 Pickering 乳液粒径随时间增加而增大的主要原因。

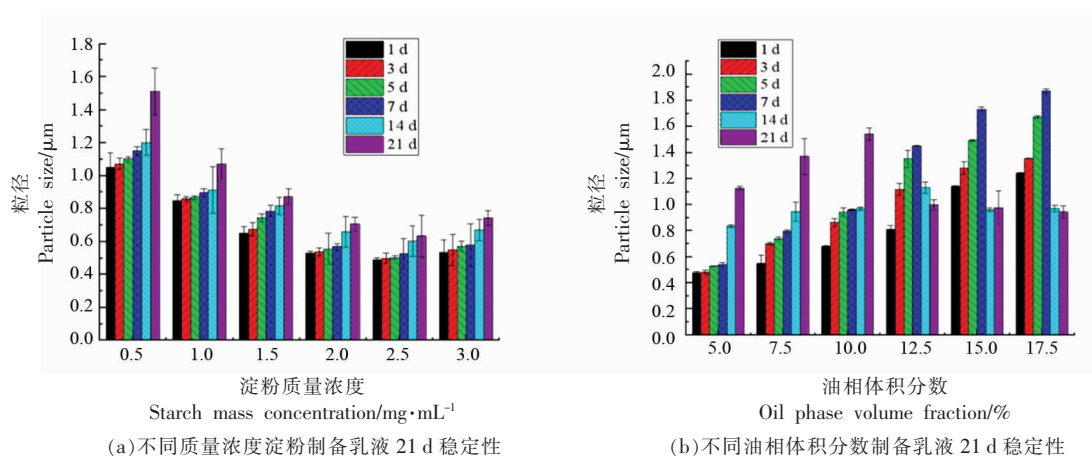


图 3 香草兰精油 Pickering 乳液 21 d 内粒径变化趋势

Fig.3 Variation trend of particle size of vanilla essential oil Pickering emulsion within 21 days

**2.2.2 乳液缓释性** Pickering 乳液的缓释性和稳定性直接关系到精油的释放效果,因此本试验用电子鼻对香草兰精油以及 Pickering 乳液进行香气释放速率分析对比。每种传感器可代表一种化学气味,检测值越小,气味越少<sup>[18]</sup>。

由图 4a 和 4b 可知,香草兰精油与 Pickering 乳液在 14 d 贮藏期间香气变化明显。与相同贮藏期香草兰精油相比,Pickering 乳液香气释放量明显减小约 100 倍。对比香草兰精油与乳液的雷达图可以看出,制备乳液前、后其香气释放轮廓并未发生明显变化,根据试验现象说明,OSA 淀粉稳定

精油制备 Pickering 乳液对精油起到了保护作用,能够有效降低精油在贮藏期间受环境影响而致香气大量损失,也证明了 Pickering 乳液在贮藏过程中具有良好的稳定性及缓释性,表明香草兰精油经过 OSA 淀粉包裹后依旧保持原有香气变化趋势,缓慢释放效果较为明显,其中以 T70/2 传感器变化最大,根据 Jafarizadeh 等<sup>[19]</sup>研究结果,芳香类物质变化较为明显。

香草兰精油及其 Pickering 乳液的二维得分投影图(PC1-PC2),可以根据样品特征对不同贮藏时间的样品进行分类,如图 4c、4d 所示。香草兰

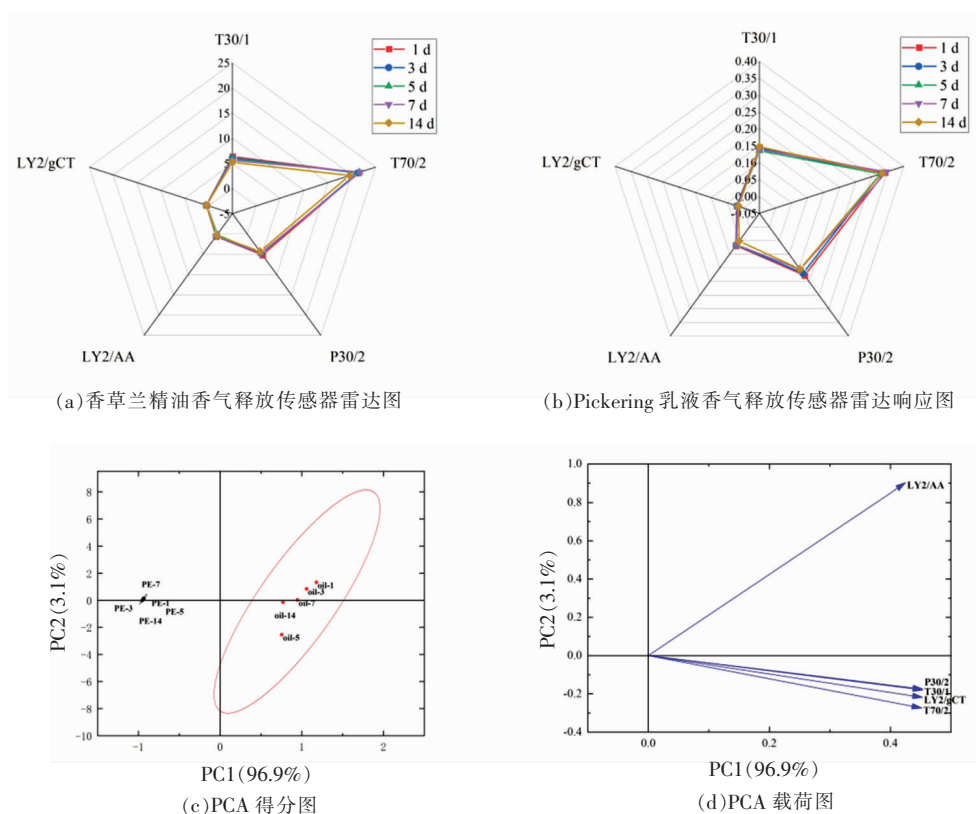


图4 香草兰精油及其 Pickering 乳液传感器响应雷达图和 PCA 得分、载荷图

Fig.4 Vanilla essential oil and Pickering emulsion aroma sensor response radar plots and PCA score

精油及 Pickering 乳液可以清楚地分开并相互区分,是由于样品间的差异主要体现在横轴方向的距离大小上。第1主成分(PC1)贡献率为96.9%,第2主成分(PC2)贡献率为3.1%。香草兰精油及 Pickering 乳液在 PC2 同侧,它们之间的距离是由于一些相似的成分的存在造成的<sup>[20]</sup>。香草兰精油制备成 Pickering 乳液后,二者风味相互独立,说明使用 OSA 淀粉稳定精油制备乳液后对精油气

味的封闭效果更好,这为精油的贮藏及应用提供了依据。

### 2.3 体外消化模拟

2.3.1 微观结构观察 通过体外模拟消化模型评价香草兰精油 Pickering 乳液的消化行为,包括口、胃和小肠。在乳液经过每个胃肠消化阶段时,观察激光共聚焦显微镜图(图5)和乳液的液滴大小(图6)。

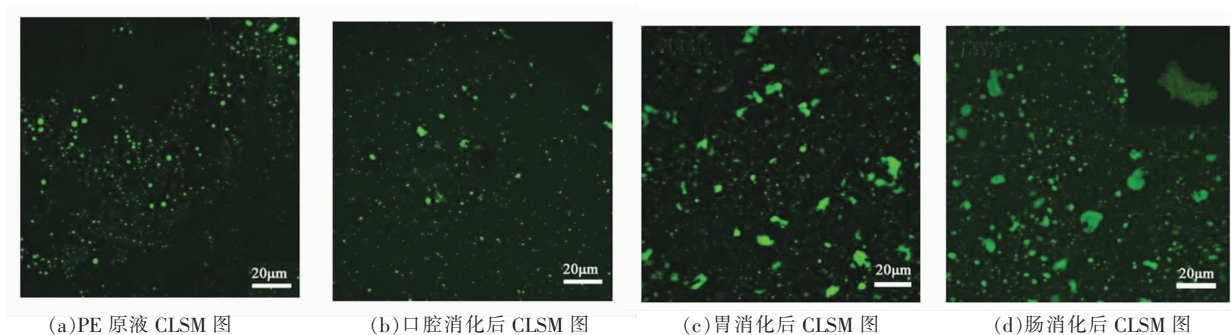


图5 香草兰精油 Pickering 乳液在体外消化过程中微观结构变化

Fig.5 Microstructure changes of vanilla essential oil Pickering emulsion during *in vitro* digestion

2.3.1.1 原乳液 在进行体外消化模拟之前, Pickering 乳液液滴均呈现球形, 分布均匀且粒径较小, 如图 5a 所示。

2.3.1.2 口腔消化阶段 Pickering 乳液在口腔消化阶段平均粒径增加, 图 5b 表明其粒径增长是由于液滴分散后再次聚集, 粒径尺寸增长至  $5.25 \mu\text{m}$ , 如图 6 所示。袁曦等<sup>[21]</sup>的结果表明, 此时口腔中乳液内部小粒径液滴数减少, 大粒径液滴数增加, 消化过程中液滴发生大量聚集。

2.3.1.3 胃消化阶段 Pickering 乳液在经过胃消化阶段后, 液滴尺寸持续增加, 由  $5.25 \mu\text{m}$  增长至  $12.41 \mu\text{m}$ , 图 5c 可观察到粒径显著变大。产生此现象是由于胃消化阶段没有酶促淀粉水解<sup>[22]</sup>, Pickering 乳液的不稳定性导致液滴在胃消化过程中发生剧烈聚集。同样由于 Pickering 乳液在低 pH 值和高盐离子强度环境下不稳定性, 乳液液滴表面的负电荷基团因离子吸附和静电屏蔽等作用, 电荷密度的显著降低, 液滴因静电斥力减弱而发生聚集<sup>[23]</sup>。

2.3.1.4 小肠消化阶段 Pickering 乳液在小肠消化阶段, 粒径达到最大值  $21.01 \mu\text{m}$ , 图 5d 中可以观察到液滴形状发生明显变化, 液滴表面不光滑且形状不规则。这是由于在胰脂肪酶作用下, 已被破坏的液滴内油相被释放后, 经胆盐进一步乳化形成的液滴相互聚集导致粒径增加<sup>[24]</sup>。同时, 由于添加了模拟肠液稀释乳液样品, 脂肪酶水解三酰基甘油并将脂质消化产物掺入乳液中。

2.3.2 FFA 释放速率的测定 使用 pH-stat 法对香草兰精油 Pickering 乳液在小肠消化过程中 FFA 释放速率进行测定, 通过记录在消化过程中 pH 值保持在中性值所需的 NaOH 体积来跟踪油脂消化程度, 消化曲线结果如图 6c 所示。

香草兰精油 Pickering 乳液在小肠消化前 20 min 内, FFA 的含量呈直线上升趋势。Pickering 乳液在 20 min 后, 脂质消化速率缓慢增加, 这是由于大多数的甘油酯已经被水解, 脂肪酶难以接近液滴内剩余少数未消化的甘油酯。在释放后 40 min 内, FFA 释放总量占总释放量的 85% (以 120 min 计算)。

乳液体外释药动力学的研究目的在于实现释药速率的可预测性和可控性。通常是建立一种模型

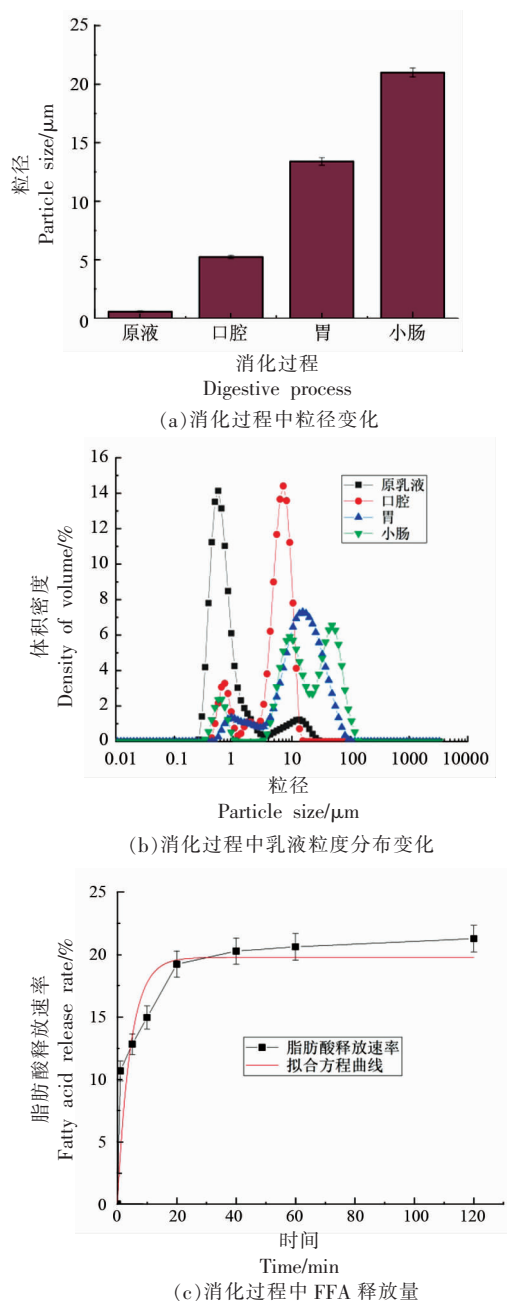


图 6 体外消化过程中乳液粒径变化趋势、粒度分布和 FFA 释放量

Fig.6 Trend of particle size variation, particle size distribution and FFA release of Pickering emulsion during *in vitro* digestion

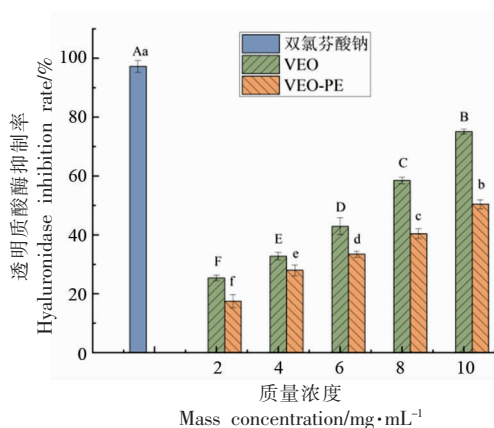
赋予参数特定的物理意义, 用来描述控制药物释放的关键因素, 并做出一定假设, 使得模型最大限度地反映实际释药体系<sup>[25]</sup>。香草兰精油 Pickering 乳液释放动力学方程的拟合结果表明, 乳液释放符合一级释放动力学模型 ( $M_0=19.78, k=0.23, R^2=$

0.99),存在初始快速释放和后续缓慢释放2个阶段。前20 min初始阶段释放率较高,是由于暴露于脂肪酶中液滴表面的香草兰精油进行了转化。随着时间的推移,FFA的释放逐渐减少并趋于稳定。Lin等<sup>[26]</sup>的研究表明,这是由于脂肪酶在消化的第1阶段水解三酰基甘油。三酰基甘油水解量增多后,FFA释放速率更缓慢。香草兰精油 Pickering 乳液的释放率较低,与OSA淀粉的高取代度和低水解率有关。

## 2.4 抗炎试验结果

**2.4.1 透明质酸酶抑制** 透明质酸酶负责透明质酸的降解,透明质酸通过介导TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\alpha$ 、IL-10和IL-4的促炎和抗炎细胞因子来调节炎症反应<sup>[27]</sup>。因此,具有抗透明质酸酶活性的药物可用于炎症过程。香草兰精油和Pickering乳液抑制透明质酸酶均是以质量浓度依赖性方式表现出更好的抗炎活性,如图7所示。在质量浓度2~10 mg/mL范围内,香草兰精油抑制率为由25.37%提高至75.07%,抑制效果均小于阳性对照双氯芬酸钠,具有显著性差异( $P < 0.05$ )。相比于精油,乳液具有较低的抑制率(17.50%~50.40%)。香草兰精油和Pickering乳液半抑制浓度 $IC_{50}$ 值分别为15.68 mg/mL和21.30 mg/mL。Kulig等<sup>[28]</sup>的研究表明,植物精油可以有效抑制促炎细胞因子的产生,增加抗炎细胞因子水平,调节关键炎症介质,例如透明质酸酶。本试验中Pickering乳液的较低抑制活性可能是由于OSA淀粉保护和乳液的缓慢释放作用。

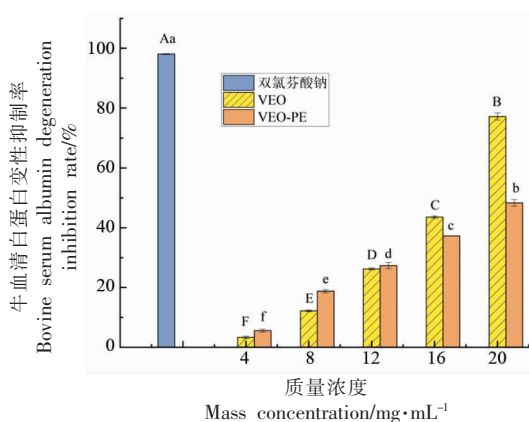
**2.4.2 牛血清白蛋白变性抑制** 如图8所示,当质量浓度低于8 mg/mL时,香草兰精油和Pickering乳液对牛血清白蛋白变性抑制差异不显著( $P > 0.05$ )。质量浓度由12 mg/mL增长至20 mg/mL时,二者抑制率差异显著( $P < 0.05$ ),分别为由26.26%、27.37%,增长至77.25%、48.34%。香草兰精油抑制牛血清白蛋白变性的半抑制浓度( $IC_{50}$ 值)为77.25 mg/mL, Pickering乳液的 $IC_{50}$ 值低于纯精油,为48.35 mg/mL。基于上述试验结果,与标准双氯芬酸钠相比,所有质量浓度的样品都显示出较低的抗炎活性且差异显著( $P < 0.05$ )。香草兰精油和乳液可以成为有效的抗炎剂是由于精油中存在高含量的醇类、醛类和萜烯类成分<sup>[29]</sup>。基于前期试验<sup>[9]</sup>,



注:A~F(a~e)表示同种样品不同质量浓度之间的差异,不同字母代表组间差异显著( $P < 0.05$ )。

图7 香草兰精油及 Pickering 乳液对透明质酸酶的抑制

Fig.7 Inhibition of hyaluronidase by vanilla essential oil and Pickering emulsion



注:A~F(a~e)表示同种样品不同质量浓度之间的差异,不同字母代表组间差异显著( $P < 0.05$ )。

图8 香草兰精油及 Pickering 乳液对牛血清白蛋白变性抑制

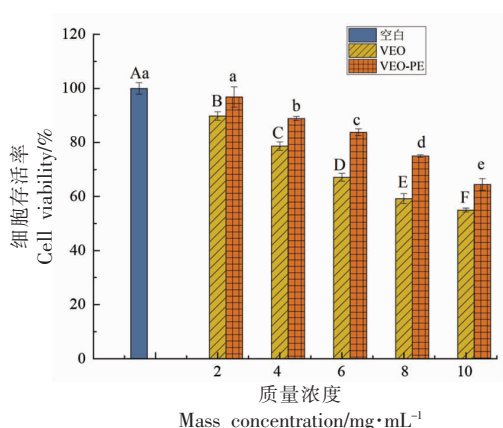
Fig.8 Inhibition of bovine serum albumin denaturation by vanilla essential oil and Pickering emulsion

香草兰精油中47%的醛类和16%的醇类发挥抗炎功效,其中 $\alpha$ -萜草烯和30.54%香兰素可以作为主要抗炎成分。

## 2.5 胡椒精油及 Pickering 乳液对人乳腺癌细胞 MCF-7 抑制作用

**2.5.1 MCF-7 细胞存活率的测定** 不同质量浓度的香草兰精油和 Pickering 乳液作用于乳腺癌细胞(MCF-7)24 h后细胞活力百分比如图9所示。经香草兰精油和 Pickering 乳液处理后,细胞





注:A~F(a~e)表示同种样品不同浓度之间的差异,不同字母代表差异显著( $P < 0.05$ )。

图 9 香草兰精油及其 Pickering 乳液对 MCF-7 增殖的影响

Fig.9 Effects of vanilla essential oil and Pickering emulsion on MCF-7 proliferation

存活率随着质量浓度的增加显著降低( $P < 0.05$ )。在 2~10 mg/mL 的质量浓度范围内,香草兰精油作用后细胞存活率由 89.79%变为 54.94%,下降了 34.85%。相同质量浓度范围内,Pickering 乳液处理后细胞存活率下降 32.38%。香草兰精油具有更显著细胞凋亡速率,香草兰精油的  $IC_{50}$  值为 11.16

mg/mL,Pickering 乳液的  $IC_{50}$  值为 14.74 mg/mL。在本试验中,OSA 淀粉可能会控制精油内有效成分的释放,增强生物活性物质对细胞的渗透,从而提高生物利用度<sup>[30]</sup>。然而,由于释放缓慢,乳液的效果在短期内略低于未包埋精油。

2.5.2 MCF-7 细胞凋亡率的测定 为研究香草兰精油及 Pickering 乳液对 MCF-7 细胞生长抑制效果,以 8~12 mg/mL 质量浓度的样品处理 MCF-7 细胞 24 h,使用 PI 及 Annexin V 对其染色,利用流式细胞术检测细胞凋亡情况,结果如图 10 所示。

在 8~12 mg/mL 的范围内,用香草兰精油处理的 MCF-7 细胞中的活细胞(Q2-3)数量显著减少( $P < 0.05$ ),从 69.00%降至 53.40%。与未处理细胞相比,晚期凋亡细胞(Q2-2)数量由 1.88%增加到 28.61%。较高的细胞凋亡率表明香草兰精油及 Pickering 乳液均能显著抑制 MCF-7 细胞的增殖( $P < 0.05$ )。综合上述结果,香草兰精油对 MCF-7 的抑制效果更好,是由于精油的亲脂性使其能够穿过细胞膜并以各种机制影响细胞<sup>[31]</sup>。Amani 等<sup>[32]</sup>的研究同样表明,精油有效抑制细胞存活的原因在于,细胞坏死引起的细胞功能障碍进而引发凋亡。

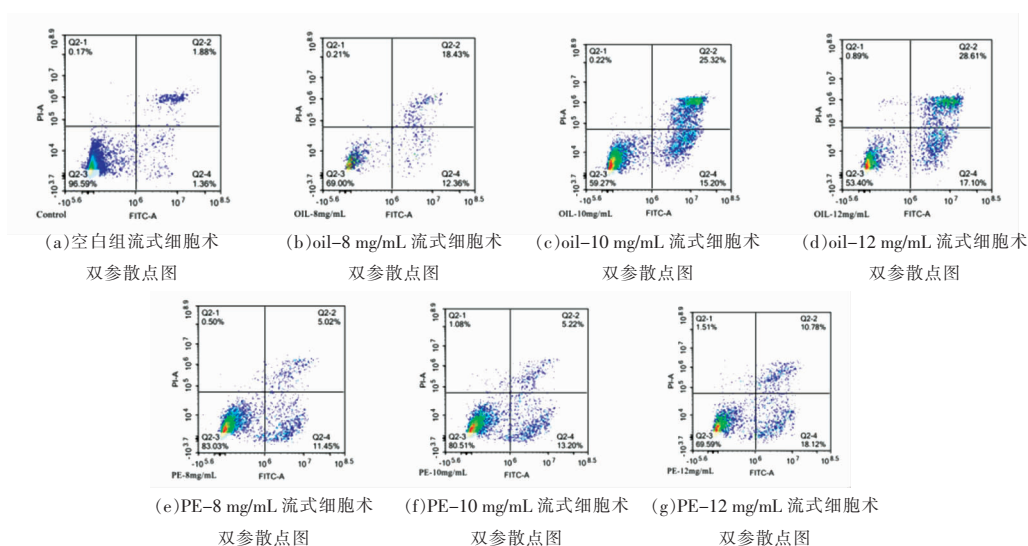


图 10 香草兰精油及 Pickering 乳液对 MCF-7 细胞凋亡的影响

Fig.10 Effects of vanilla essential oil and Pickering emulsion on apoptosis of MCF-7 cells

### 3 结论

以 OSA-淀粉制备香草兰精油 Pickering 乳液

粒径最小可达  $(0.54 \pm 0.01) \mu\text{m}$ ,光学显微镜观察乳液液滴小且均一,颗粒完整。将精油制备成 Pick-

ering 乳液后可有效延缓香气释放,提高精油体内抗消化能力。香草兰精油及其 Pickering 乳液均具有较强体外抗炎活性,二者对透明质酸酶和牛血清白蛋白变性具有较强抑制作用。与未经处理的 MCF-7 细胞相比,经精油和乳液处理后的 MCF-7 晚期凋亡细胞增多,香草兰精油的抗癌细胞增殖活性显著高于 Pickering 乳液。本文对香草兰精油及制备 Pickering 乳液后功能活性变化进行对比,为香草兰精油功能性研究奠定基础,同样为其进一步开发应用提供数据支撑。

### 参 考 文 献

- [1] DIVAKARAN M, BABU K N. Micropropagation and *in vitro* conservation of vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews)[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2009, 547: 129-138.
- [2] SINHA A K, SHARMA U K, SHARMA N. A comprehensive review on vanilla flavor: Extraction, isolation and quantification of vanillin and others constituents[J]. *International Journal of Food Sciences & Nutrition*, 2008, 59(4): 299-326.
- [3] 王艺潼, 张彦军, 徐飞, 等. 辛烯基琥珀酸淀粉-可可精油 Pickering 乳液制备及稳定性研究[J]. *食品科学技术学报*, 2021, 39(6): 87-97.  
WANG Y T, ZHANG Y J, XU F, et al. Study on preparation and stability of octenyl succinic acid starch-cocoa essential oil Pickering emulsion [J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2021, 39(6): 87-97.
- [4] 谢安琪, 邓苏梦, 左白露, 等. 面筋蛋白粒子-黄原胶 Pickering 乳液的制备及其表征[J]. *食品科学*, 2019, 40(16): 38-44.  
XIE A Q, DENG S M, ZUO B L, et al. Preparation and characterization of wheat gluten nanoparticles-xanthan gum Pickering emulsion[J]. *Food Science*, 2019, 40(16): 38-44.
- [5] SINTÈS M, BELADJINE M, BOCCARA D, et al. 416 co-encapsulation of immuno-active and anti-inflammatory molecules in a Pickering emulsion for inflammatory dermatoses therapeutic approach[J]. *Journal of Investigative Dermatology*, 2019, 139(9): S286.
- [6] LOW L E, TAN L T H, GOH B H, et al. Magnetic cellulose nanocrystal stabilized Pickering emulsions for enhanced bioactive release and human colon cancer therapy[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 127: 76-84.
- [7] ROY S, RHIM J W. Gelatin/agar-based functional film integrated with Pickering emulsion of clove essential oil stabilized with nanocellulose for active packaging applications[J]. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2021, 627: 127220.
- [8] GAO Y, WU X L, MCCLEMENTS D J, et al. Encapsulation of bitter peptides in water-in-oil high internal phase emulsions reduces their bitterness and improves gastrointestinal stability[J]. *Food Chemistry*, 2022, 386: 132787.
- [9] 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]. *Food*, 2022, 11(7): 987.
- [10] ZHU H M, ZHANG Y J, TIAN J W, et al. Effect of a new shell material - Jackfruit seed starch on novel flavor microcapsules containing vanilla oil [J]. *Industrial Crops and Products*, 2018, 112: 47-52.
- [11] AISSA I, ZNATI M, ZARDI-BERGAOUI A, et al. GC and GC-MS integrated analyses and *in vitro* antibacterial, anticholinesterase, anti-tyrosinase, and anti-5-lipoxygenase potential of *Inula viscosa* root fractionated essential oil[J]. *South African Journal of Botany*, 2019, 125: 386-392.
- [12] COSTA W K, DE OLIVEIRA A R S, DE OLIVEIRA A M, et al. Essential oil from *Eugenia stipitata* McVaugh leaves has antinociceptive, anti-inflammatory and antipyretic activities without showing toxicity in mice[J]. *Industrial Crops and Products*, 2020, 144: 112059.
- [13] ZHANG M H, ZHU J R, ZHOU L, et al. Antarctic krill oil high internal phase Pickering emulsion stabilized by bamboo protein gels and the anti-inflammatory effect *in vitro* and *in vivo*[J]. *Journal of Functional Foods*, 2022, 94: 105134.
- [14] SHUJAAEDIN H Y, AL-HAJ N A, RASEDEE A, et al. Recombinant human erythropoietin reduces viability of MCF-7 breast cancer cells from 3D cul-

- ture without caspase activation[J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2021, 28(4): 2549–2557.
- [15] 李迪. 挤压酯化改性淀粉稳定的 Pickering 乳液制备及其性质研究[D]. 沈阳: 沈阳师范大学, 2020.
- LI D. Preparation and properties of Pickering emulsion stabilized by extrusion esterified modified starch [D]. Shenyang: Shenyang Normal University, 2020.
- [16] BIDUSKI B, KRINGEL D H, COLUSSI R, et al. Electrospayed octenyl succinic anhydride starch capsules for rosemary essential oil encapsulation[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 132: 300–307.
- [17] PICKERING S U. CXCVI. – Emulsions[J]. Journal of the Chemical Society, Transactions, 1907, 91: 2001–2021.
- [18] 李芸, 黄凌云. 醋酸乙烯-乙烯乳液用于低气味环境友好高性能涂料[J]. 涂料工业, 2012, 42(8): 51–53.
- LI Y, HUANG L Y. VAE emulsions for low odor environmental friendly high – performance coatings [J]. Coatings Industry, 2012, 42(8): 51–53.
- [19] JAFARIZADEH-MALMIRI H, ANARJAN N, BERENJIAN A. Developing three-component ginger-cinnamon-cardamom composite essential oil nanoemulsion as natural food preservatives[J]. Environmental Research, 2022, 204: 112133.
- [20] HANIF M A, NAWAZ H, NAZ S, et al. Raman spectroscopy for the characterization of different fractions of hemp essential oil extracted at 130 °C using steam distillation method [J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2017, 182: 168–174.
- [21] 袁曦, 刘晓娟, 曹庸. 赋型剂乳液粒径和菠菜加工方式对菠菜中 $\beta$ -胡萝卜素生物可给性的影响 [J]. 食品科学, 2019, 40(21): 78–87.
- YUAN X, LIU X J, CAO Y. Effect of particle size of excipient emulsion and blanching on bioaccessibility of  $\beta$ -carotene from spinach[J]. Food Science, 2019, 40(21): 78–87.
- [22] LIN Q Q, LIANG R, ZHONG F, et al. Effect of degree of octenyl succinic anhydride (OSA) substitution on the digestion of emulsions and the bioaccessibility of  $\beta$ -carotene in OSA-modified-starch-stabilized-emulsions [J]. Food Hydrocolloids, 2018, 84: 303–312.
- [23] 余振宇. OSA 改性芋头淀粉基 Pickering 乳液运载体系稳定机制及其特性研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2020.
- YU Z Y. Stability mechanism and characteristics of Pickering emulsion delivery system base on OSA-modified taro starch-based[D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2020.
- [24] JAIN S, WINUPRASITH T, SUPHANTHARIKA M. Encapsulation of lycopene in emulsions and hydrogel beads using dual modified rice starch: Characterization, stability analysis and release behaviour during *in-vitro* digestion [J]. Food Hydrocolloids, 2020, 104: 105730.
- [25] 滕丽晶. 星型聚乳酸基载药微球的制备、表征及其体外释药性能研究[D]. 合肥: 安徽大学, 2015.
- TENG L J. Preparation and characterization of drug-loaded microspheres base on star-shaped polylactic (*L*-latide) and studies on their *in vitro* release behaviors[D]. Hefei: Anhui University, 2015.
- [26] LIN Q Q, LIANG R, ZHONG F, et al. Physical properties and biological fate of OSA-modified-starch-stabilized emulsions containing  $\beta$ -carotene: Effect of calcium and pH[J]. Food Hydrocolloids, 2018, 77: 549–556.
- [27] FRONZA M, CAETANO G F, LEITE M N, et al. Hyaluronidase modulates inflammatory response and accelerates the cutaneous wound healing [J]. PLoS One, 2014, 9(11): e112297.
- [28] KULIG M, GALANTY A, GRABOWSKA K, et al. Assessment of safety and health-benefits of *Citrus hystrix* DC. peel essential oil, with regard to its bioactive constituents in an *in vitro* model of physiological and pathological skin conditions[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2022, 151: 113151.
- [29] RANI R, SHARMA S. Recent advances in medicinal applications of essential oil[J]. Materials Today: Proceedings, 2022, 68(5): 891–898.
- [30] MENG X Y, LIU H, DONG X Y, et al. A soft Pickering emulsifier made from chitosan and peptides endows stimuli-responsiveness, bioactivity and biocompatibility to emulsion[J]. Carbohydrate Polymers, 2022, 277: 118768.
- [31] ULLAH H, WILFRED C D, SHAHARUN M S. Ionic liquid based ultrasonication-assisted extraction of essential oil from the leaves of *Persicaria minor* and conductor-like screening model for realistic solvents study[J]. Se Pu, 2017, 35(6): 656–664.

- [32] AMANI F, REZAEI A, DAMAVANDI M S, et al. *in vitro* cytotoxicity [J]. Food Chemistry, 2022, 377: 131998.  
Colloidal carriers of almond gum/gelatin coacervates for rosemary essential oil: Characterization and *in-*

### Studies on Preparation, Properties and Functionality of Vanilla Essential Oil Pickering Emulsion

Wang Yitong<sup>1,2,3,4</sup>, Qin Yajuan<sup>1,2,3,4</sup>, Xu Fei<sup>1,3,4</sup>, Zhang Yanjun<sup>1,3,4\*</sup>, Wang Ping<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Spice and Beverage Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agriculture Sciences, Wanning 571533, Hainan

<sup>2</sup>College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040

<sup>3</sup>Key Laboratory of Processing Suitability and Quality Control of the Special Tropical Crops of Hainan Province, Wanning 571533, Hainan

<sup>4</sup>Hainan Provincial Engineer in Research Center of Tropical Spice and Beverage Crops, Wanning 571533, Hainan)

**Abstract** In order to protect essential oils, control the release and expand the scope of application, vanilla essential oil was used as raw material to prepare Pickering emulsion in which the OSA starch was used as solid particle stabilizer by shear ultrasonic technology. The stability properties and aroma release rates were investigated to explore the changes in the emulsion digestion process, the anti-inflammatory and anti-proliferative properties of MCF-7 cells of Pickering emulsions and essential oil. The results showed that the droplets of Pickering emulsion had smooth surface and complete particles with the minimum particle size of 0.54  $\mu\text{m}$ . The storage stability of essential oils can be effectively improved by Pickering emulsion. The emulsion effectively reduced the aroma release rate of the internal essential oil by about 100 times. Pickering emulsion showed significant resistance to digestion, so that the free fatty acid release rate reaches 22.35% within 120 min. The vanilla essential oil still maintained high anti-inflammatory activities in the form of Pickering emulsion. Compared with untreated MCF-7 cells, the stronger anti-proliferative effects were both found in essential oil and Pickering emulsion. These results showed that the vanilla essential oil prepared with Pickering emulsion can effectively be increased for the solubility of essential oils, the stability, and the application scope. Therefore, this experiment can provide a theoretical basis for the application of vanilla essential oil, especially the application of functional medicine.

**Keywords** vanilla essential oil; Pickering emulsion; anti-inflammatory activity; MCF-7 inhibition