DOI:10.12441/spyswjs.20230317001 [文章编号] 1673-1689(2025)07-0103-11

高内相乳液包埋玉米黄质及其稳定性研究

李 亚[1,2] 欧 莹[1,2] 卢 杰[1,2] 孟 铄[1,2] 冯守帅[1,2] 杨海麟[1,2*]

(1.江南大学生物工程学院,江苏 无锡 214122;2.江南大学工业生物技术教育部重点实验室,江苏 无锡 214122)

摘要:【目的】制备高度稳定的高内相乳液(high internal phase emulsions,HIPEs)包埋玉米黄质,以提高玉米黄质的稳定性,拓展其在食品和医药领域的应用。**【方法】**采用明胶-壳聚糖悬浮液制备HIPEs,用于包埋从枸杞中提取的玉米黄质;利用超高效合相色谱(ultra-performance convergence chromatography,UPCC)分离玉米黄质,通过激光共聚焦扫描显微镜(confocal laser scanning microscope,CLSM)观察乳液结构,根据流变学分析评估乳液的特性,并结合过氧化氢稳定性和贮藏稳定性测试,评估HIPEs包埋对玉米黄质稳定性的改善效果。**【结果】**利用UPCC分离出玉米黄质仅需2.14 min,HIPEs的最优制备条件为:明胶溶液和壳聚糖溶液的质量分数均为0.50%,明胶和壳聚糖的质量比为4∶1,pH为5。CLSM结果显示,利用明胶-壳聚糖悬浮液成功制备了HIPEs。流变学分析的结果显示,负载玉米黄质的HIPEs表现出类固体的弹性行为,其储能模量均高于损耗模量。CLSM结果显示,随着玉米黄质质量分数的增加,负载玉米黄质的HIPEs中油滴聚集且挤压变形,乳液的稳定性逐渐降低。稳定性测试的结果表明,相较于直接溶解于十二烷,HIPEs包埋有效降低了玉米黄质的降解速率,其在过氧化氢处理后的保留率提高了17.98%,在4 ℃贮藏条件下的保留率提升了90.09%。**【结论】**采用明胶-壳聚糖悬浮液制备的HIPEs包埋玉米黄质,可有效改善玉米黄质的稳定性并延长货架期,为解决玉米黄质应用受限问题提供了新思路。

关键词:明胶;壳聚糖;玉米黄质;高内相乳液;稳定性

Zeaxanthin Encapsulated with High Internal Phase Emulsions and Its Stability

LI Ya[1,2] *OU Ying*[1,2] *LU Jie*[1,2] *MENG Shuo*[1,2] *FENG Shoushuai*[1,2] *YANG Hailin*[1,2*]

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: [**Objective**] This study prepared highly stable high internal phase emulsions (HIPEs) to encapsulate zeaxanthin, thereby improving the stability and expanding the food and pharmaceutical applications of zeaxanthin. [**Method**] HIPEs were prepared with the gelatin-chitosan suspension for encapsulation of zeaxanthin extracted from goji berries. Ultra-performance convergence chromatography (UPCC) was employed to separate zeaxanthin. Confocal laser scanning microscopy (CLSM) was employed to observe the emulsion structure. The rheological analysis was performed to characterize the emulsion, which was combined with the hydrogen peroxide and storage stability tests to evaluate the performance of encapsulation with HIPEs in improving the stability of zeaxanthin. [**Result**] The separation of zeaxanthin by UPCC needed only 2.14 min. The optimal preparation conditions for HIPEs were as follows: mass fractions of both gelatin and chitosan solutions were 0.50%, a gelatin-to-chitosan mass ratio of 4∶1, and pH 5. The CLSM results showed that HIPEs were

基金项目:国家“十四五”重点研发计划项目(2022YFC3401300);国家自然科学基金面上项目(21776113,21878128)。

通信作者:杨海麟(1971—),男,博士,教授,博士研究生导师,主要从事发酵工程、生物制造及化学品、能源、海洋、环境等领域的生物生产数字化智能化改造研究。E-mail:bioprocessor@126.com

收稿日期:2023-03-17 **修回日期:**2023-04-27

successfully prepared with the gelatin-chitosan suspension. The rheological analysis results showed that HIPEs loaded with zeaxanthin exhibited solid-like elastic behavior, and their storage moduli were higher than loss moduli. The CLSM results showed that with the increase in the mass fraction of zeaxanthin, the oil droplets in zeaxanthin-loaded HIPEs were aggregated, extruded, and deformed, which gradually reduced the stability of the emulsion. The stability test results showed that compared with zeaxanthin directly dissolved in dodecane, the encapsulation in HIPEs effectively reduced the degradation rate of zeaxanthin and increased the retention rate after hydrogen peroxide treatment and storage at 4 ℃ by 17.98% and 90.09%, respectively. [**Conclusion**] Using HIPEs prepared with the gelatin-chitosan suspension for encapsulation helps to improve the stability and extend the shelf life of zeaxanthin, which provides a new strategy to overcome the limitations of zeaxanthin utilization.
Keywords: gelatin; chitosan; zeaxanthin; high internal phase emulsions; stability

玉米黄质是一种天然色素，广泛存在于枸杞、玉米、花卉等植物中[1-2]。玉米黄质与叶黄素互为同分异构体，是人体视网膜黄斑区的主要色素，可预防老年性黄斑变性、白内障、视网膜病变等眼部疾病，对近视的预防也有一定作用[3]。人体不能自行合成玉米黄质，必须从饮食或膳食补充剂中获得。研究表明，每天饮食补充至少 11 mg的玉米黄质和叶黄素，可以提高视网膜黄斑色素的光学密度[4]。枸杞果实是天然玉米黄质的优质来源，枸杞中的玉米黄质二棕榈酸酯可通过碱液水解转化为高纯度的游离玉米黄质。玉米黄质在自然条件下具有疏水性、脂溶性和不稳定性（玉米黄质的结构易由全反式转变为顺式异构体），这些特性削弱了它原本的生物活性和生物可及性[5]，限制了其在功能性食品、食品添加剂和医药领域中的应用。用乳液包埋玉米黄质可以提高其稳定性，从而提高玉米黄质的生物活性，扩大其应用范围。

HIPEs是一种内相体积分数大于74%的乳液体系，分散相体积分数过高会使乳液油滴破裂并聚集，导致油滴尺寸不均，最后破坏乳液体系[6]。为了更好地稳定HIPEs体系，通常需将乳化剂复配使用。明胶有亲水性和乳化性，适用于制备水包油（O/W）体系的乳液。壳聚糖具有生物可降解、毒性小等特点，与明胶进行乳化交联可以在水-油界面形成稳定的薄膜，从而改善乳液体系的稳定性[7]。Li等[8]用京尼平交联壳聚糖微凝胶稳定的HIPEs，显著提高了β-胡萝卜素的稳定性，使β-胡萝卜素的负载量达到2.0%（以质量分数计）。Liu等[9]研究表明，HIPEs的凝胶网状结构延缓了β-胡萝卜素在胃肠道中的降解。Ho等[10]用吐温-80等混合溶剂制备高度稳定的类胡萝卜素微乳液，提高了类胡萝卜素的生物利用度。Yan等[11]在研究用辛烯基琥珀酸酐-淀粉/壳聚糖稳定的HIPEs对β-胡萝卜素的包埋释放时，也发现类胡萝卜素保留率增加的现象。综上所述，用明胶和壳聚糖制备的HIPEs包埋玉米黄质在提高玉米黄质的稳定性方面有较好的理论和应用可行性。

作者以明胶-壳聚糖悬浮液为水相，探究了不同水相条件对HIPEs性质的影响；以十二烷作为玉米黄质的溶剂，探究玉米黄质质量分数对负载玉米黄质的HIPEs稳定性的影响，用CLSM观察了HIPEs和负载玉米黄质的HIPEs的微观结构，并测定了负载玉米黄质的HIPEs的稳定性。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

枸杞干果：青海翔宇农业科技有限公司；玉米黄质标准品：上海源叶生物科技有限公司；壳聚糖（脱乙酰度≥95%，黏度为0.2~0.4 Pa·s）：上海易恩化学技术有限公司；明胶、正己烷、无水乙醇、甲醇、氢氧化钠、乙酸、2，6-二叔丁基对甲酚（BHT）、尼罗红：国药集团化学试剂有限公司；甲基叔丁基醚、十二烷：上海麦克林生化科技有限公司。

1.2 仪器与设备

旋转流变仪：MCR302型，奥地利安东帕公司；高速分散机：D-1型，德国ART MICCRA公司；光学显微镜：OLYMPUS CX31型，日本奥林巴斯公司；CLSM：TCS SP8型，德国徕卡微系统有限公司；紫外分光光度计：UV-5200型，上海元析仪器有限公司；超临界流体色谱系统：ACQUITY UPC^{2}型，美国沃特世公司。

1.3　方法

1.3.1　玉米黄质的制备

枸杞干果粉碎后过100目筛网，称取一定质量的枸杞粉末，向枸杞粉末中分别加入2倍体积的1.0 mol/L氢氧化钾-甲醇溶液和0.000 1 g/mL的BHT，搅拌均匀后在60 ℃皂化20 min，冷却至室温后以体积比1∶2加入体积分数50%的正己烷-无水乙醇溶液浸提60 min，收集提取液以8 000 r/min离心20 min，最后将所有上清液在旋转蒸发仪中于60 ℃浓缩至干，得到枸杞玉米黄质提取物，将其贮藏在-20 ℃冰箱中。

1.3.2　玉米黄质的鉴定

用UPCC分析枸杞中的玉米黄质。色谱条件为：Viridis BEH色谱柱（3.0 mm×100 mm×1.7 μm）；流动相为超临界CO_2与甲醇，体积比为90∶10，流量为1 mL/min，进样体积10 μL，样品溶剂为甲基叔丁基醚，在444 nm下检测。

1.3.3　HIPEs的制备

用去离子水配制明胶溶液，用质量分数为1%的乙酸溶液制备壳聚糖溶液。在明胶溶液中缓慢滴入壳聚糖溶液后搅拌均匀，调节pH为3~8，得到明胶-壳聚糖悬浮液。悬浮液置于磁力搅拌器上，将明胶-壳聚糖悬浮液以体积比1∶3均匀、缓慢地滴入十二烷中，用高速分散机以30 000 r/min均质90 s，得到明胶-壳聚糖悬浮液制备的HIPEs，分散后静置一段时间使体系稳定。

1.3.4　负载玉米黄质的HIPEs的制备

制备负载玉米黄质的HIPEs时，参照Li等[8]的方法并稍加修改。用十二烷溶解玉米黄质提取物，使玉米黄质的质量分数分别为0.08%、0.10%、0.12%、0.16%。按照1.3.3的方法制备HIPEs，将HIPEs与不同质量分数的玉米黄质-十二烷溶液高速分散，制备负载玉米黄质的HIPEs。

1.3.5　乳液的流变性能检测

用旋转流变仪测定乳液的流变性能。平行板直径为25 mm，间隙设为1.0 mm，测试温度恒定并设为25 ℃，剪切速率设为1×10^{-1}~1×10^{2} s^{-1}。采用应变扫描的方式测定样品储能模量（G'）和损耗模量（G''）的变化，测定频率为1 Hz，应变为0.1%~1 000.0%，角频率为0.1~100.0 rad/s（固定应变为0.1%）。

1.3.6　乳液的微观结构观察

利用光学显微镜在100倍下观察乳液的微观结构：吸取适量乳液置于载玻片上观察。利用CLSM观察乳液的微观结构：取1.0 g的乳液，用50 μL 1.0 mg/mL尼罗红染液对乳液染色15 min[12]，激发波长为488 nm，检测发射光波长为595 nm。

1.3.7　玉米黄质稳定性测定

1）玉米黄质标准曲线：用正己烷溶解玉米黄质标准品，配制成不同质量分数梯度的溶液，在444 nm下测定吸光度，绘制标准曲线，见式（1），R^2为0.999 85。

$$y=(308.77x-6.38)/100 \tag{1}$$

式中：

x——玉米黄质标准品溶液的吸光度；

y——玉米黄质的质量分数，%。

2）玉米黄质保留率：玉米黄质的保留率可以反映其稳定性，计算方法见式（2）。

$$R=\frac{W_1}{W_0}\times100 \tag{2}$$

式中：

R——玉米黄质保留率，%；

W_0——乳液中玉米黄质的起始质量分数，%；

W_1——乳液贮藏后玉米黄质的质量分数，%。

利用分光光度法测定溶液吸光度，并根据式（1）计算玉米黄质的质量分数。对照组为溶解在正己烷中的玉米黄质，用正己烷稀释到适宜浓度后测定吸光度。乳液中玉米黄质的质量分数测定方法：取乳液样品1.0 g，加入1 mL的二甲基亚砜，涡旋混匀10 s，在8 000 r/min下离心60 s，将上清液用正己烷萃取，离心后取上清液，并测定吸光度。

3）负载玉米黄质的HIPEs的过氧化氢稳定性：将玉米黄质溶于十二烷中，与质量分数为2%的过氧化氢溶液混合，得到对照组。并将明胶-壳聚糖悬浮液与质量分数2%的过氧化氢溶液混合均匀，加入溶有玉米黄质的油相后经高速均质制备得到HIPEs。然后把HIPEs包埋的玉米黄质组和对照组置于磁力搅拌器上不断搅拌8 h，每2 h取样检测玉米黄质的质量浓度，计算保留率的变化。

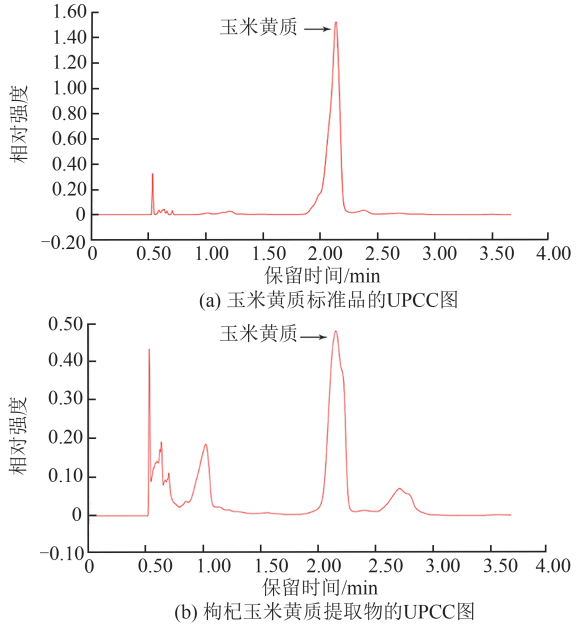
4）负载玉米黄质的HIPEs的贮藏稳定性：将包埋玉米黄质的HIPEs（试验组）和溶解在十二烷

中的玉米黄质（对照组）分别置于 4 ℃和 25 ℃条件下贮藏一段时间，每 7 d 检测玉米黄质的质量浓度，计算保留率的变化。所有结果以平均值±标准偏差表示。

2 结果与讨论

2.1 UPCC 定性分析枸杞来源的玉米黄质

用 UPCC 分析枸杞玉米黄质提取物中的玉米黄质，结果见图 1。枸杞玉米黄质提取物中的玉米黄质与标准品的出峰时间均为 2.14 min，因此确定枸杞玉米黄质提取物与标准品是同一物质，说明枸杞来源的玉米黄质已被成功分离。Inbaraj 和孔谦等[13-14]用传统的高效液相色谱法分别在 19.52 min 和 9.16 min 检测出玉米黄质。传统方法的耗时是 UPCC 的 4 倍以上，因此 UPCC 有效减少了玉米黄质的降解，并且由于流动相中 CO_2 的体积分数达到 90%，可使有机溶剂的消耗减少。因此，通过 UPCC 检测枸杞来源的玉米黄质具有高效、绿色、安全的特点。



(a) 玉米黄质标准品的UPCC图

(b) 枸杞玉米黄质提取物的UPCC图

图 1 玉米黄质标准品与样品的 UPCC 图

Fig. 1 UPCC chromatograms of zeaxanthin standard and sample

2.2 明胶-壳聚糖悬浮液制备的 HIPEs 的性质分析

2.2.1 不同明胶-壳聚糖悬浮液对 HIPEs 流变性能的影响

乳液的流变性能可反映食品的质地和稳定性，也可用于食品开发过程中的产品优化[15]。由图 2（a）可知，剪切速率为 1×10^{-1}~1×10^{2} s^{-1} 时，含不同质量分数明胶的明胶溶液制备的 HIPEs，其剪切黏度随剪切速率的增加而下降，这种现象称为剪切稀化。产生这种现象是因为高剪切速率下油滴会聚集絮凝，使 HIPEs 越剪越稀，这与已报道的文献结果类似[9]。当明胶的质量分数从 0.05% 增加到 0.50% 时，HIPEs 的剪切黏度升高。说明明胶的质量分数越大，HIPEs 的黏性越强。模量可以反映 HIPEs 的黏弹性，G' 表示 HIPEs 的类固体行为，而 G'' 表示 HIPEs 的类液体行为。

含不同质量分数明胶的明胶溶液制备的 HIPEs，其黏弹性随剪切应变的变化见图 2（b）。在低剪切应变下，HIPEs 的 G' 大于 G''，说明低剪切应变下的 HIPEs 表现出类固体的弹性行为。随后，当剪切应变升至较高水平后，HIPEs 的 G'' 总是大于 G'，说明这时的 HIPEs 表现出类液体的黏性行为。同时，明胶的质量分数越大，HIPEs 的 G' 和 G'' 越大，说明随着明胶质量分数增加，HIPEs 形成的凝胶网状结构增强，Du 等[7]用明胶制备的 HIPEs 也有此现象。

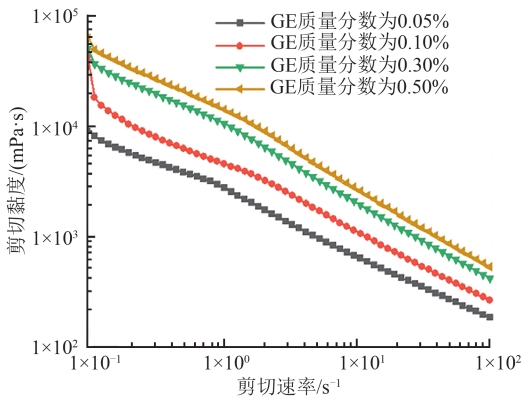
含不同质量分数壳聚糖的壳聚糖溶液制备的 HIPEs，其剪切黏度随剪切速率的变化见图 2（c）。各 HIPEs 都表现出非牛顿流体特性，呈现出明显的剪切稀化现象。此外，当壳聚糖质量分数为 0.50% 时，HIPEs 的剪切黏度高于其在壳聚糖质量分数为 0.10% 和 2.00% 时的剪切黏度。可能原因是壳聚糖质量分数为 2.00% 时，明胶溶液与壳聚糖溶液未能完全结合。

含不同质量分数壳聚糖的壳聚糖溶液制备的 HIPEs，其模量变化见图 2（d）。低剪切应变下，HIPEs 的 G' 均高于 G''，超出一定的剪切应变时，HIPEs 的 G'' 大于 G'，说明含不同质量分数壳聚糖的壳聚糖溶液制备的 HIPEs 都具有黏弹性行为。当壳聚糖的质量分数为 0.10% 时，HIPEs 的 G' 和 G'' 均为最小。同时，在低剪切应变下，壳聚糖的质量分数为 0.50% 时，HIPEs 的 G' 大于其余组的 G'，但随着剪切应变增加，HIPEs 的 G'' 大于 G'。该现象的原因可能是：在高剪切应变下 HIPEs 流动导致液滴结构重排，在 Tan 等[16]的报道中也有类似现象。结合图 2（c）的结果，壳聚糖质量分数为 0.50% 时，HIPEs

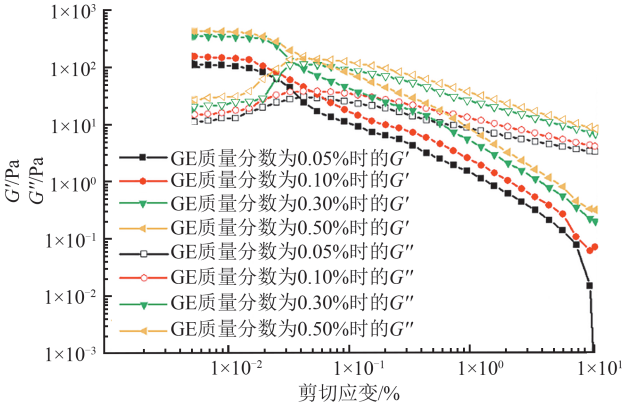
黏性最强，说明其稳定性较强。

由图2(e)可知，明胶和壳聚糖质量比不同时，制备的HIPEs均呈剪切稀化。相比于明胶和壳聚糖的质量比分别为4∶1和1∶1时制备的HIPEs，明胶和壳聚糖的质量比为20∶1时，所制备HIPEs的剪切黏度随剪切速率增加而下降得最快。但总体而言，这3组HIPEs的剪切黏度变化趋势相似，当明胶和壳聚糖的质量比为1∶10时，制备的HIPEs的剪切黏度最低。

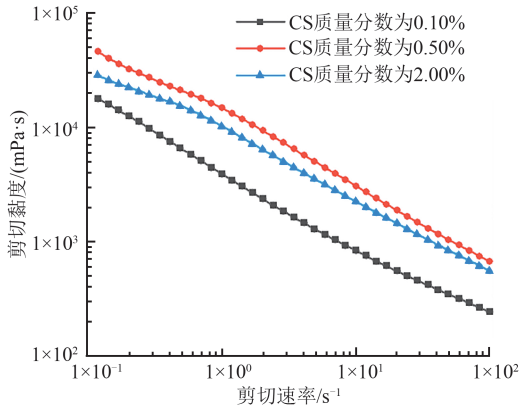
不同质量比的明胶和壳聚糖所制备HIPEs的模量随剪切应变的变化见图2(f)。低剪切应变下，明胶和壳聚糖的质量比为20∶1、4∶1和1∶1



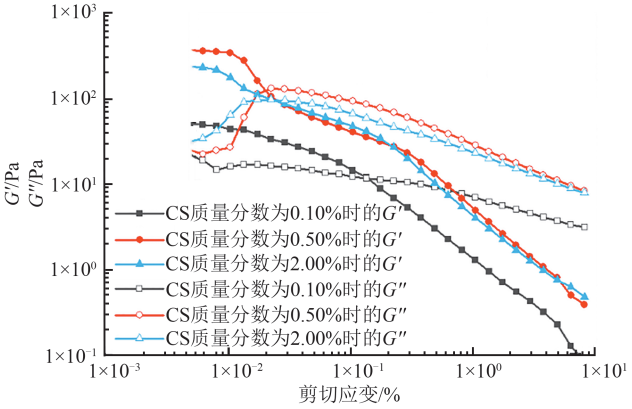
(a) 明胶的质量分数对HIPEs剪切黏度的影响



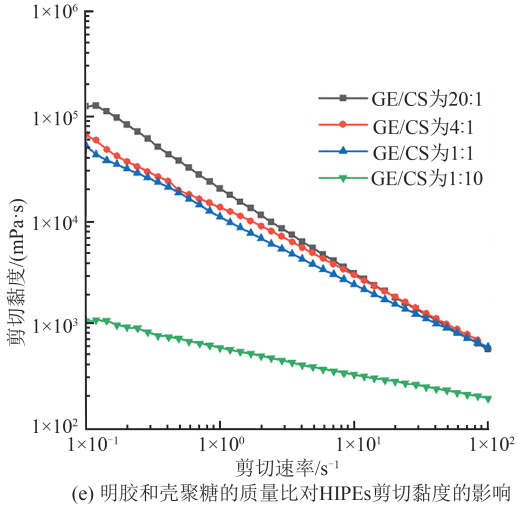
(b) 明胶的质量分数对HIPEs模量的影响



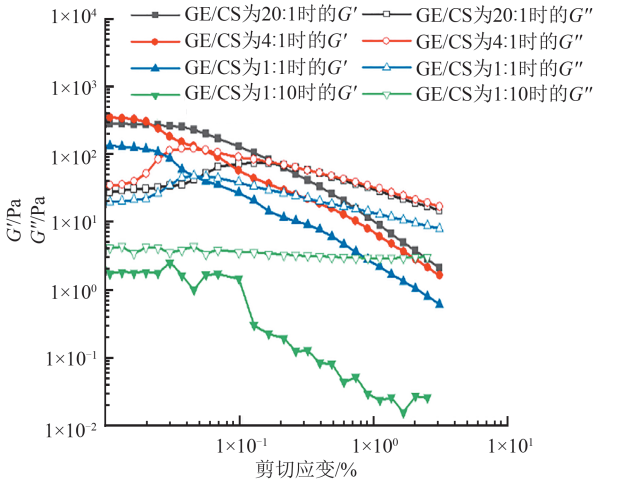
(c) 壳聚糖的质量分数对HIPEs剪切黏度的影响



(d) 壳聚糖的质量分数对HIPEs模量的影响



(e) 明胶和壳聚糖的质量比对HIPEs剪切黏度的影响



(f) 明胶和壳聚糖的质量比对HIPEs模量的影响

GE—明胶；CS—壳聚糖；GE/CS—明胶和壳聚糖的质量比。

图2　明胶、壳聚糖的质量分数及其质量比对HIPEs流变性能的影响

Fig. 2　Effects of gelatin and chitosan mass fractions and mass ratio on rheological properties of HIPEs

时，所制备的HIPEs的G'均大于G''，此时HIPEs有类固体的弹性行为；随后，剪切应变增加，乳液的G''大于G'，此时HIPEs有类液体的黏性行为。结果表明，明胶和壳聚糖质量比为20∶1、4∶1、1∶1时，制备的HIPEs均有稳固的凝胶网状结构，而明胶用量多的HIPEs的凝胶网状结构更坚固。此外，明胶和壳聚糖质量比为1∶10时，制备的HIPEs的G''在全部的剪切应变范围内均大于G'，HIPEs总是表现出类液体的黏性行为。说明明胶和壳聚糖质量比为1∶10时，HIPEs的凝胶网状结构强度较弱。这些现象表明，明胶的质量分数对HIPEs的稳定性有重要影响，且掺入少量壳聚糖可提高HIPEs的稳定性，这得益于HIPEs高黏度的显著特征[17]。

2.2.2 不同pH对HIPEs形成的影响

连续相（水相）pH是影响HIPEs凝胶稳定性的关键因素，主要是因为pH可以对乳化剂的带电量和乳化剂之间的相互作用力产生影响。通常情况下，多糖乳化剂的带电性能不易改变，但是带电量少的乳化剂产生的乳液液滴难以提供静电斥力，使其乳化性能相对较差[8]。此外，pH会改变蛋白质乳化剂电荷的正负，乳液油滴的尺寸会随着电荷的变化而改变[18]。

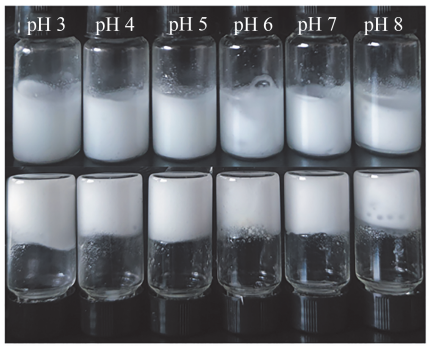
pH为3~8时制得的HIPEs外观见图3（a）。酸性条件下HIPEs完全分散，中性条件下HIPEs有部分分层。pH为6时，HIPEs虽有均匀的外观，但在长时间静置的过程中会发生分层和漏油现象。pH为8时，HIPEs立即产生严重的油水分层。说明偏酸性条件下制备的HIPEs更稳定[19]。100倍光学显微镜下观察到的HIPEs微观结构见图3（b）。pH≥6时油滴变形，呈不规则多边形；pH<6时油滴基本呈均匀的圆形，油滴整体大小均一、排列紧密。

由图3（c）可知，HIPEs的剪切黏度随着剪切速率的增加而下降，呈现明显的剪切稀化现象。pH为3~4时制得乳液的剪切黏度变化相似，在剪切速率为$1\times10^{1}\ s^{-1}$时，其剪切黏度均高于pH为7时制得的乳液。此现象主要归因于明胶与壳聚糖之间的相互作用受pH的影响，在中性pH下HIPEs的凝胶网状结构易被破坏[20]。相比于pH为3~7时，pH为8时制得的HIPEs剪切黏度最低，且下降趋势非常明显，可能是因为该pH下的HIPEs有不溶性絮状物析出，明胶与壳聚糖之间的相互作用力变弱，油滴直径变大，高剪切速率下HIPEs的剪切黏度降低。Yan等[19]的研究表明，辛烯基琥珀酸酐淀粉/壳聚糖复合物在pH为6时制备的HIPEs具有最大黏度，此条件下HIPEs内部更容易形成凝胶状结构，并且在pH为7时结构被破坏，黏度降低。由图3（c）可知，pH为5时HIPEs的剪切黏度最大，表明此时HIPEs液滴的凝胶网状结构最为坚固[21]。

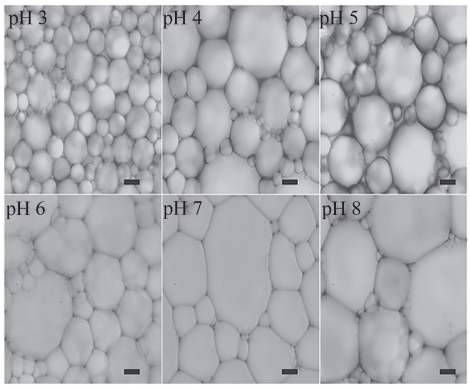
由图3（c）~（d）可知，不同pH下制备的HIPEs的G'变化与其剪切黏度变化基本一致，G'越高，HIPEs在宏观上越表现为固体。但在pH为3~4时，在一定剪切应变下G'骤降，说明在低剪切应变下HIPEs形成的网状结构较强，高剪切应变下网状结构可能被破坏。且在低剪切应变下，G'总是大于G''，此时HIPEs表现出弹性行为。在高剪切应变下，剪切模量降低表明结构断裂，此时被视为线性黏弹性区域的末端，这与Zhao等[22]的研究结果一致。当G'与G''相交后，G''总是大于G'，代表HIPEs表现出类似黏性的特性，也说明了此时HIPEs开始流动以进行凝胶向溶胶过渡。当pH为5~8时，剪切应变升至较高水平后HIPEs的G''才高于G'，说明在此范围内pH越大，HIPEs的凝胶网状结构越弱。先前的研究表明[6]，G'与G''交叉点出现得越晚，HIPEs稳定性越强。由图3（d）可知，pH为5~6时制备的HIPEs的G'与G''交叉点出现最晚，由于pH为5时制备的HIPEs的G'总体大于pH为6时制备的HIPEs的G'，并且大于其余组的G'，说明pH为5时HIPEs的凝胶网状结构更坚固。

2.2.3 HIPEs的CLSM图像

用CLSM进一步观察明胶-壳聚糖悬浮液（明胶和壳聚糖的质量分数分别为0.50%、质量比为4∶1、pH为5）制备的HIPEs的微观结构。HIPEs的形成条件是存在水相和油相或有机相。HIPEs被尼罗红染色后的微观结构见图4，绿色荧光部分是油相被染色的区域，在未被挤压时大部分油滴呈现圆形。这是因为油相被水相包围，水-油界面是由明胶和壳聚糖通过一系列相互作用形成的结构致密、坚固的复合薄膜[23]。这种结构表明HIPEs形成了明显的（O/W）界面。使用单一表面活性剂

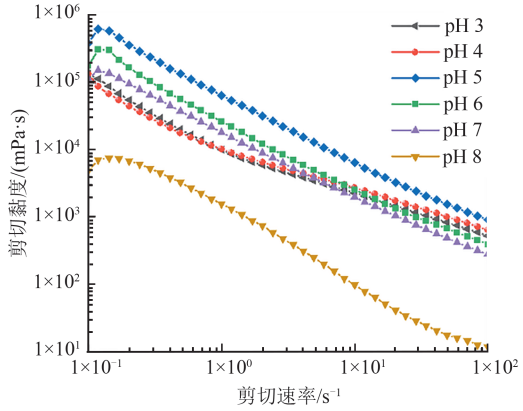


(a) pH对HIPEs外观的影响

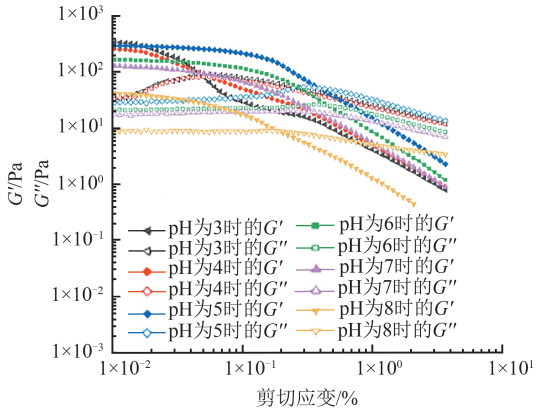


光学显微镜的比例尺为10 μm。

(b) pH对HIPEs微观结构的影响



(c) pH对HIPEs剪切黏度的影响



(d) pH对HIPEs模量的影响

图 3　不同 pH 对 HIPEs 的外观、微观结构以及流变特性的影响

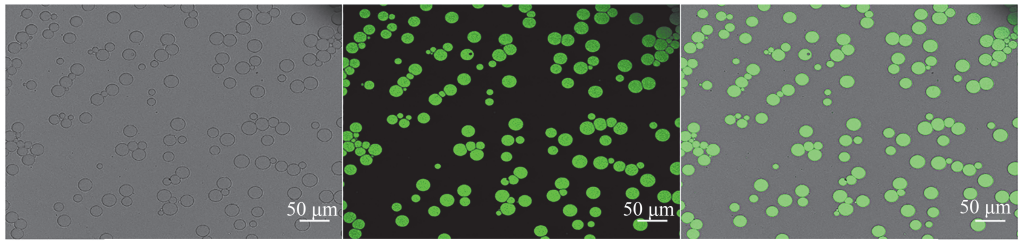
Fig. 3　Effects of different pH on the appearance, microstructure, and rheological properties of HIPEs

制备的HIPEs界面厚度较薄，容易破裂。Jie等[24]的研究表明，仅使用壳聚糖（质量分数≤0.50%），所制备的HIPEs的凝胶网状结构较弱，导致油滴泄漏，从而发生破乳。因此，将明胶与壳聚糖配合使用，可以规避使用单一表面活性剂制备HIPEs的缺陷，从而得到更稳定的HIPEs。

2.3　负载玉米黄质的HIPEs的性质特征

2.3.1　负载玉米黄质的HIPEs的微观特征

包埋玉米黄质会影响HIPEs的微观结构和流动性。用CLSM观察负载不同质量分数玉米黄质的HIPEs的颗粒形态。由图5可知，负载质量分数为0.08%的玉米黄质的HIPEs，其油滴排列紧密、层层交叠，油滴尺寸普遍较小。当玉米黄质的质量分数为0.10%、0.12%时，HIPEs的水相区域增大，部分油滴被挤压融合，使乳液的流动性降低，常炜等[25]也得到类似结论。当玉米黄质的质量分数为0.16%时，大部分油滴被挤压变形，导致油滴尺寸增大，呈现出不规则形状，这是油滴聚集的结果。可能



(a) 明场　(b) 荧光场　(c) 合并场

图 4　HIPEs 的 CLSM 图像

Fig. 4　CLSM images of HIPEs

因为玉米黄质负载量较高时，玉米黄质除了被包埋在HIPEs的油滴内部外，还分布在油滴表面。表明玉米黄质负载量较高时，对HIPEs稳定性的破坏力更强。

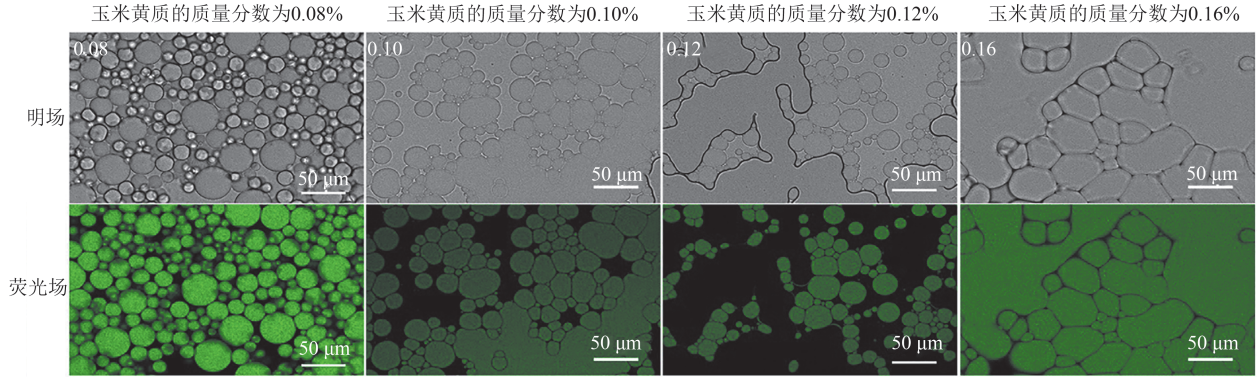


图 5　包埋不同质量分数玉米黄质的HIPEs的CLSM图像

Fig. 5　CLSM images of HIPEs encapsulated with different mass fractions of zeaxanthin

为进一步分析玉米黄质在HIPEs中的分布情况，将负载不同质量分数玉米黄质的HIPEs在8 000 r/min条件下离心，此时HIPEs中的油相出现在上层，检测析出油相中玉米黄质的质量分数与HIPEs中玉米黄质的质量分数，两者的比值可用来分析玉米黄质的分布情况[8]。图6为负载玉米黄质的HIPEs离心后，析出油相中玉米黄质的质量分数与HIPEs中玉米黄质总质量分数的比值。在低负载量下，油相中玉米黄质的质量分数较低；高负载量下，油相中玉米黄质的质量分数较高。说明随着玉米黄质质量分数增加，乳液体系变得不稳定。主要原因是部分玉米黄质会附着在水-油界面，高速离心后，乳液内部结构发生少量破坏，使HIPEs未能完全包埋玉米黄质。

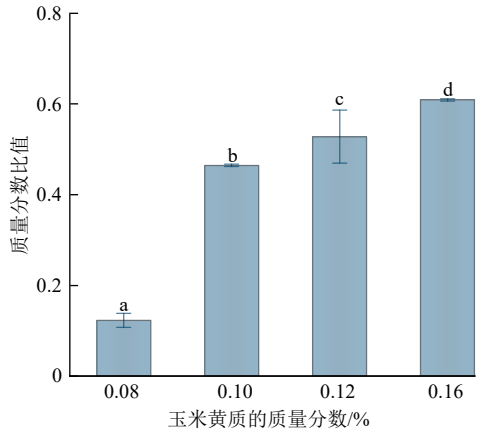


图 6　乳液离心后析出油相中玉米黄质的质量分数与乳液体系中玉米黄质总质量分数的比值

Fig. 6　Ratio of the mass fraction of zeaxanthin in the oil phase separated from the emulsion after centrifugation to the total mass fraction of zeaxanthin in the emulsion system

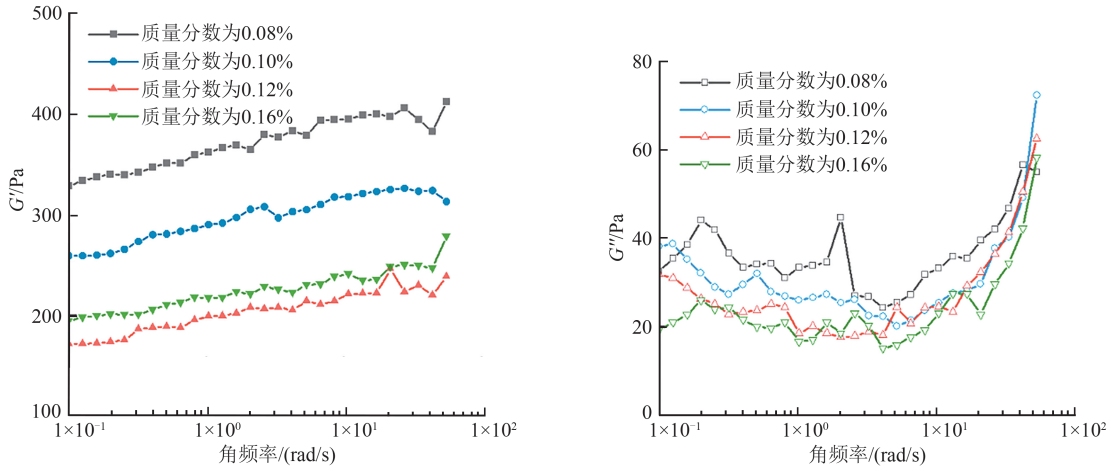
2.3.2　负载玉米黄质的HIPEs的流变性能

负载不同质量分数玉米黄质的HIPEs的G'和G''随角频率的变化曲线见图7。随着角频率增加，G'增幅较小。当角频率超过1×10^{1} rad/s时，G''呈上升趋势，且玉米黄质负载量为0.16%（以质量分数计）的HIPEs具有较大的G''上升幅度，说明此时HIPEs的凝胶网状结构强度较弱[26]。此外，各组HIPEs的G'均高于G''，表明HIPEs表现出弹性行为，可能是因为玉米黄质的负载量对HIPEs的黏弹性没有显著影响。由图6可知，高负载量下，HIPEs未能完全包埋玉米黄质，部分油滴外溢，导致HIPEs的稳定性下降。此结果与图5中的结果一致。综上所述，玉米黄质会降低HIPEs的凝胶强度，使其在某种程度上表现为液体，进一步论证了负载玉米黄质的HIPEs添加在食品体系中的可行性[8-9]。

2.4　负载玉米黄质的HIPEs的稳定性分析

2.4.1　过氧化氢溶液对负载玉米黄质的HIPEs稳定性的影响

玉米黄质本身是一种强大的抗氧化剂[1-2]，为探究氧化剂对负载玉米黄质的HIPEs稳定性的影响，用质量分数为2%的过氧化氢溶液分别处理溶解在十二烷中的玉米黄质（油相中的玉米黄质）和负载质量分数为0.08%的玉米黄质的HIPEs（乳液中的玉米黄质），处理时间为8 h，结果见图8（a）。



(a) 玉米黄质质量分数对G'的影响　(b) 玉米黄质质量分数对G''的影响

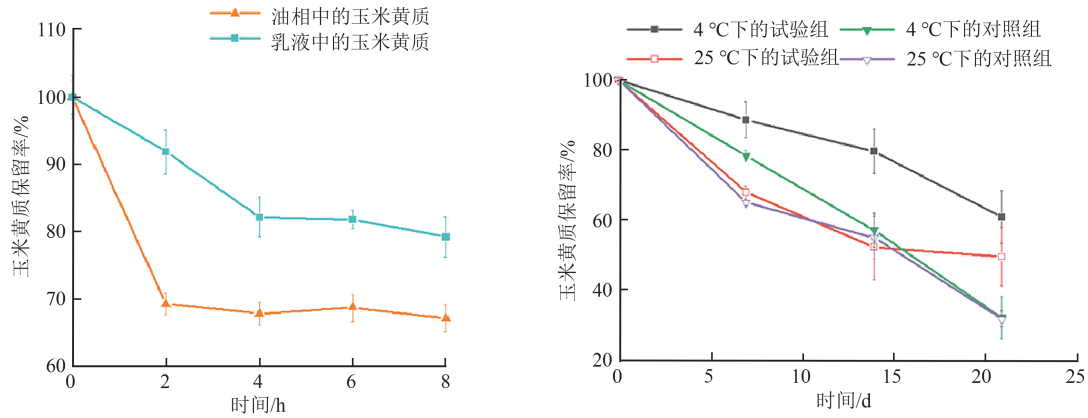
图 7　负载玉米黄质的HIPEs的流变性能

Fig. 7　Rheological properties of HIPEs loaded with zeaxanthin

随着处理时间延长，玉米黄质保留率均呈下降趋势，且前 2 h 的下降幅度最大，4 h 后下降速率缓慢。说明 2 h 内玉米黄质与过氧化氢产生了最大的接触，导致部分玉米黄质发生降解。此后，油滴表面附近的玉米黄质被过氧化氢完全降解，使得 2 h 以后玉米黄质的保留率维持在较缓慢的下降速率。过氧化氢处理 8 h 后，负载玉米黄质的 HIPEs 中玉米黄质的保留率降至 79.19%，直接溶解于油相的玉米黄质的保留率降至 67.12%。HIPEs 包埋使玉米黄质的保留率提高了 17.98%，说明 HIPEs 的结构可以在一定程度上阻碍玉米黄质与过氧化氢发生反应，从而增强玉米黄质的稳定性。有研究报道[8]，用质量分数为 5% 的过氧化氢溶液处理 HIPEs 包埋的番茄红素，保留率只提高了 10.57%。因此，用明胶-壳聚糖悬浮液制备的 HIPEs 包埋玉米黄质，可改善玉米黄质的稳定性。

2.4.2　负载玉米黄质的 HIPEs 的贮藏稳定性

由图 8(b)可知，随贮藏时间延长，在 0~21 d、4 ℃下试验组中玉米黄质的保留率始终最高。贮藏 21 d 时，4 ℃和 25 ℃下试验组中玉米黄质的保留率分别为 60.83% 和 49.46%，对照组中玉米黄质的保留率分别为 32.00% 和 31.73%。4 ℃和 25 ℃下，HIPEs 包埋使玉米黄质的保留率分别提高了 90.09% 和 55.88%。原因可能是长期贮藏会导致玉米黄质的化学结构发生异构化和降解[8]；还有可能是负载玉米黄质的 HIPEs 长时间处于 25 ℃条件下，其凝胶网状结构部分瓦解，释放出一部分的玉米黄质。在低温条件下，HIPEs 的凝胶网状结



(a) 过氧化氢溶液对负载玉米黄质的HIPEs稳定性的影响　(b) 负载玉米黄质的HIPEs的贮藏稳定性

图 8　负载玉米黄质的 HIPEs 的稳定性

Fig. 8　Stability of HIPEs loaded with zeaxanthin

构能维持强稳定性，大部分玉米黄质附着在网状空间里，减少与外界环境的接触，说明HIPEs的包埋作用可能会阻碍氧气的进入，与Knockaert等[27]的研究结果类似。因此，HIPEs的包埋可以延长玉米黄质的贮藏时间，并且4 ℃的低温环境更有利于贮藏负载玉米黄质的HIPEs。

3 结论

用明胶-壳聚糖悬浮液制备的HIPEs来包埋从枸杞中提取的玉米黄质。为了制备高质量的HIPEs，对明胶和壳聚糖的质量浓度、质量比以及pH进行了优化。结果显示，用质量分数均为0.50%的明胶溶液和壳聚糖溶液，且明胶和壳聚糖质量比为4∶1，pH为5时，成功制备了O/W乳液体系，并且HIPEs表现出坚固的凝胶网状结构。进一步利用HIPEs包埋玉米黄质，其负载量（以质量分数计）可达0.16%。玉米黄质负载量高的HIPEs，油滴聚集严重，乳液体系不稳定。玉米黄质负载量低的HIPEs，油滴尺寸较小，具备良好稳定性。此外，相比于直接溶解在十二烷中，负载玉米黄质的HIPEs表现出更好的玉米黄质贮藏稳定性，其在过氧化氢处理后的保留率提高了17.98%，在4 ℃贮藏条件下的保留率提升了90.09%。该研究为玉米黄质在食品和医药领域的应用提供了依据。

参考文献

[1] ISABELLE M，LEE B L，LIM M T，et al. Antioxidant activity and profiles of common vegetables in Singapore [J]. Food Chemistry，2010，120(4)：993-1003.

[2] 孟繁玲，张宇，徐少博，等. 南瓜中游离叶黄素的制备及抗氧化活性[J]. 食品与生物技术学报，2020，39(8)：81-88.
MENG F L，ZHANG Y，XU S B，et al. Manufacture process and antioxidant activity of free lutein from *Cucurbita moschata* Duch.[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2020，39(8)：81-88.(in Chinese)

[3] MURILLO A G，HU S Q，FERNANDEZ M L. Zeaxanthin：metabolism，properties，and antioxidant protection of eyes，heart，liver，and skin[J]. Antioxidants，2019，8(9)：390.

[4] WILSON L M，THARMARAJAH S，JIA Y X，et al. The effect of lutein/zeaxanthin intake on human macular pigment optical density：a systematic review and meta-analysis[J]. Advances in Nutrition，2021，12(6)：2244-2254.

[5] DE CAMPO C，ASSIS R Q，DA SILVA M M，et al. Incorporation of zeaxanthin nanoparticles in yogurt：influence on physicochemical properties，carotenoid stability and sensory analysis[J]. Food Chemistry，2019，301：125230.

[6] ZHOU F Z，HUANG X N，WU Z L，et al. Fabrication of zein/pectin hybrid particle-stabilized Pickering high internal phase emulsions with robust and ordered interface architecture [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry，2018，66(42)：11113-11123.

[7] DU J，DAI H J，WANG H X，et al. Preparation of high thermal stability gelatin emulsion and its application in 3D printing[J]. Food Hydrocolloids，2021，113：106536.

[8] LI W，NIAN Y Q，HUANG Y C，et al. High loading contents，distribution and stability of β-carotene encapsulated in high internal phase emulsions[J]. Food Hydrocolloids，2019，96：300-309.

[9] LIU W，GAO H X，MCCLEMENTS D J，et al. Stability，rheology，and β-carotene bioaccessibility of high internal phase emulsion gels[J]. Food Hydrocolloids，2019，88：210-217.

[10] HO N H，INBARAJ B S，CHEN B H. Utilization of microemulsions from *Rhinacanthus nasutus*（L.）Kurz to improve carotenoid bioavailability[J]. Scientific Reports，2016，6：25426.

[11] YAN C，WU X L，WANG Y，et al. Utilization of polysaccharide-based high internal phase emulsion for nutraceutical encapsulation：enhancement of carotenoid loading capacity and stability[J]. Journal of Functional Foods，2021，84：104601.

[12] WANG Y Q，FAN B，TONG L T，et al. High internal phase emulsions stabilized solely by soy protein isolate [J]. Journal of Food Engineering，2022，318：110905.

[13] INBARAJ B S，LU H，HUNG C F，et al. Determination of carotenoids and their esters in fruits of *Lycium barbarum* Linnaeus by HPLC-DAD-APCI-MS [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis，2008，47(4/5)：812-818.

[14] 孔谦，黄文洁，吴绍文，等. 一种同时测定十种类胡萝卜素的液相色谱方法的建立[J]. 生物技术通报，2022，38(11)：80-89.
KONG Q，HUANG W J，WU S W，et al. Establishment of HPLC method for simultaneous determination of ten carotenoids[J]. Biotechnology Bulletin，2022，38(11)：80-89.(in Chinese)

[15] DICKINSON E. Emulsion gels: the structuring of soft solids with protein-stabilized oil droplets [J]. Food Hydrocolloids, 2012, 28(1): 224-241.

[16] TAN H, SUN G Q, LIN W, et al. Gelatin particle-stabilized high internal phase emulsions as nutraceutical containers [J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2014, 6(16): 13977-13984.

[17] HAYATI I N, CHE-MAN Y B, TAN C P, et al. Stability and rheology of concentrated O/W emulsions based on soybean oil/palm kernel olein blends[J]. Food Research International, 2007, 40(8): 1051-1061.

[18] FENG X, DAI H J, MA L, et al. Food-grade gelatin nanoparticles: preparation, characterization, and preliminary application for stabilizing Pickering emulsions [J]. Foods, 2019, 8(10): 479.

[19] YAN C, MCCLEMENTS D J, ZHU Y Q, et al. Fabrication of OSA starch/chitosan polysaccharide-based high internal phase emulsion *via* altering interfacial behaviors [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(39): 10937-10946.

[20] LI M F, HE Z Y, LI G Y, et al. The formation and characterization of antioxidant Pickering emulsions: effect of the interactions between gliadin and chitosan [J]. Food Hydrocolloids, 2019, 90: 482-489.

[21] DJOULLAH A, HUSSON F, SAUREL R. Gelation behaviors of denaturated pea albumin and globulin fractions during transglutaminase treatment [J]. Food Hydrocolloids, 2018, 77: 636-645.

[22] ZHAO S L, CUI F Z, MA C C, et al. High internal phase emulsions stabilized by native and heat-treated lactoferrin-carboxymethyl chitosan complexes: comparison of molecular and granular emulsifiers[J]. Food Chemistry, 2022, 370: 130507.

[23] 徐宏蕾，王亚珍，谢晶，等. 壳寡糖对壳聚糖-明胶复合膜的牛肉保鲜性能影响[J]. 食品与生物技术学报，2018，37(10)：1048-1053.
XU H L, WANG Y Z, XIE J, et al. Effect of chitosan oligosaccharide on preservation of beef of gelatin-chitosan composite films [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2018, 37(10): 1048-1053.(in Chinese)

[24] JIE Y L, CHEN F S, ZHU T W, et al. High internal phase emulsions stabilized solely by carboxymethyl chitosan [J]. Food Hydrocolloids, 2022, 127: 107554.

[25] 常炜，史秋兰，赵正阳，等. 高内相乳液法制备聚丙烯酰胺多孔水凝胶及应用[J]. 化工进展，2022，41(7)：3832-3839.
CHANG W, SHI Q L, ZHAO Z Y, et al. Preparation and application of polyacrylamide porous hydrogel by high internal phase emulsion polymerization [J]. Chemical Industry and Engineering Progress, 2022, 41(7): 3832-3839.(in Chinese)

[26] DIMITROVA T D, LEAL-CALDERON F. Bulk elasticity of concentrated protein-stabilized emulsions[J]. Langmuir, 2001, 17(11): 3235-3244.

[27] KNOCKAERT G, PULISSERY S K, LEMMENS L, et al. Carrot β-carotene degradation and isomerization kinetics during thermal processing in the presence of oil [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(41): 10312-10319.

（责任编辑：金文苑）