

## 黑皮油松松针精油纳米乳液的制备及稳定性研究

王雪薇 李德海\*

(东北林业大学 林学院/黑龙江省森林食品资源利用重点实验室,哈尔滨 150040)

**摘要** 为提高黑皮油松松针精油的水溶性和乳化稳定性,本研究利用旋涡混合仪和微射流仪制备纳米乳液,以分层体积和三元相图中的乳化区面积为指标,确定活性剂的种类及配比(Km)等制备纳米乳液的最优条件,并进一步分析了纳米乳液的结构、粒径、多分散项系数(PDI)及稳定性。结果表明:1)黑皮油松松针精油纳米乳液的最佳配方为精油 16.14%、复合表面活性剂 10.45%( $m(\text{无水乙醇}):m(\text{Tween 80})=4:1$ )和蒸馏水 73.41%;2)黑皮油松松针精油纳米乳液有淡蓝色微乳光,液滴呈球形且分布均匀,粒径为 35 nm,PDI 为 0.165;3)稳定性实验研究表明,在室温条件下储存 60 d 和在 pH=7 的水相环境中,纳米乳液的平均粒径和 PDI 无明显变化,表现了较好的储藏稳定性,最佳储藏时间为 30 d;热稳定性实验表明,松针精油纳米乳液昙点温度为 80 °C,具有良好的热稳定性;4)抑菌稳定性实验结果显示,与未乳化的精油相比,松针精油纳米乳液具有更强的抑菌活性。本研究制备的黑皮油松松针精油纳米乳液具有较好的水溶性和稳定性,且与精油相比,抑菌能力更强。

**关键词** 黑皮油松; 精油; 纳米乳液; 稳定性

中图分类号 TS202.3

文章编号 1007-4333(2021)11-0123-10

文献标志码 A

## Preparation and stability of *Pinus tabulaeformis* pine needle essential oil nanoemulsion

WANG Xuewei, LI Dehai\*

(Forestry College /Key Laboratory of forest food resources utilization of Heilongjiang Province,  
Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

**Abstract** In order to improve the water solubility and emulsifying stability of *Pinus tabulaeformis* needle essential oil, the nano emulsion was prepared by the swirling mixer and microfluidic apparatus. By using the volume fraction of the emulsion and the area of the emulsion in three phase diagram, the best conditions for the preparation of nano emulsion were determined and the structure, particle size and multiple fractions of the nano emulsion Km, PDI and stability were analyzed. The results showed that: 1) The optimal formula of *P. tabulaeformis* needle essential oil nanoemulsion was 16.14% of essential oil, 10.45% of compound surfactant (4:1 of absolute alcohol and Tween 80), and 73.41% of distilled water; 2) *P. tabulaeformis* needle essential oil nanoemulsion had light blue microemulsion, and the droplets were spherical and distributed evenly, with a diameter of 35 nm, PDI is 0.165; 3) The stability experiment showed that the average particle size and PDI of nanoemulsion had no obvious change under the condition of storing 60 days at room temperature and in pH=7 aqueous phase environment, which showed better storage stability. The best storage time was 30 days. The thermal stability test showed that the temperature of the pine needle essential oil nanoemulsion was 80 °C, which had good thermal stability; 4) The antibacterial stability experiment results showed that the pine needle essential oil nano emulsion had better antibacterial activity compared with the non-emulsified essential oil. In

收稿日期: 2021-02-03

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金资助(2572019BA04);哈尔滨市科技局创新研究基金项(2017RAQXJ091);黑龙江省自然科学基金面上项目(C2015062)

第一作者: 王雪薇,硕士研究生,E-mail: 359705107@qq.com

通讯作者: 李德海,副教授,主要从事食品化学及植物有效成分研究,E-mail: lidehaineau@163.com

conclusion, the *P. tabulaeformis* needle essential oil nanoemulsion prepared in this study had good water solubility and stability, and its bacteriostatic ability was enhanced compared with essential oil.

**Keywords** *Pinus tabulaeformis*; essential oil; nanoemulsion; stability.

黑皮油松(*Pinus tabulaeformis* var. *mukdensis*), 是松杉目、松科和松属常绿乔木<sup>[1]</sup>, 主要分布于中国河北省、辽宁省和黑龙江省等地。黑皮油松精油(Essential oil of *P. tabulaeformis* needles, EOPTN)是最重要的松类副产品, 主要从松针中提取, 具有特殊的芳香气味、抑菌能力强和抗氧化等性能, 因此作为天然的抑菌剂被应用于食品行业中<sup>[2]</sup>。但黑皮油松松针精油和其他精油一样, 易挥发, 对光和热高敏感, 水溶性差<sup>[3]</sup>, 导致在应用时受到限制。

近年来纳米乳化技术在解决精油水溶性及稳定性等问题上取得了显著效果<sup>[4]</sup>。通过纳米乳化技术制备的纳米乳液(Nanoemulsion)是1类粒径大小为10~100 nm的胶体分散系统, 是1种均匀且呈透明或半透明状的液体<sup>[5]</sup>, 可有效提高精油等脂溶性物质的溶解度。目前已有研究表明, 使用表面活性剂和助表面活性剂制备的纳米乳液可提高精油的溶解性、稳定性和生物活性<sup>[6]</sup>。在纳米乳液制备中表面活性剂和助表面活性剂的使用可以减少界面张力, 加快精油的亲脂性成分快速分散到食品体系中, 提高了精油纳米乳液的稳定性。Adel等<sup>[7]</sup>研究发现橘皮精油纳米乳化后由于使用表面活性剂和助表面活性剂提高了精油的溶解性; 张培旗等<sup>[8]</sup>利用高压微射流制备的生姜纳米乳液稳定性好, 可以延长酱油的货架期, 储存28 d酱油未出现聚沉现象。此外, 纳米乳液分散性好、稳定性强和渗透力高的特点可以提高精油的利用率<sup>[9]</sup>。Nazia等<sup>[10]</sup>在制备百里香精油纳米乳液时发现乳化包埋技术可以提高精油的生物活性从而提高精油的利用率。

本研究采用吐温(Tween)和聚氧乙烯蓖麻油(Crempphor)作为表面活性剂, 采用无水乙醇、正丁醇和丙三醇作为助表面活性剂制备黑皮油松松针精油纳米乳液, 测定其纳米乳液的形态、粒径、分布情况和稳定性, 研究制备黑皮油松松针精油纳米乳液稳定性高和抑菌性强的最佳配方, 以期在实际生产和生活中提高黑皮油松松针精油的利用价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

黑皮油松松针于2019年5月采摘于东北林业

大学帽儿山林场, 将新鲜松针晾干粉碎后过60目筛, 置于常温下保存; 大肠杆菌(*Escherichia coli* ATCC25922)和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* rosen bach ATCC6538)来自于东北林业大学黑龙江省森林食品资源利用重点实验室。

无水乙醇(化学纯)、正丁醇(化学纯)、丙三醇(化学纯)、Tween 80(化学纯)、聚氧乙烯蓖麻油(化学纯)和肉膏蛋白胨培养基, 购自天津致远化学试剂有限公司。

### 1.2 仪器与设备

蒸汽灭菌锅(申安, 上海); 摇摆式高速万能粉碎机(林大, 温岭); 电子天平(丹佛, 上海); 电热恒温转风干燥箱(恒科, 上海); UV-1750紫外可见分光光度计(岛津, 日本); 旋涡混合仪(达姆, 上海); M-110动态高压微射流(Microfluidic, 美国); ZetasizerNano-ZS90纳米粒度仪(耐克特, 山东); 透射电子显微镜(徕卡, 德国)。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 黑皮油松松针精油的制备

黑皮油松松针精油提取采用水蒸气蒸馏法, 以宗芳芳等<sup>[11]</sup>的方法为参照。准确称取黑皮油松松针粉末50.00 g, 装入1000 mL的圆底烧瓶中, 按照料液比1:6(g/mL)加入300 mL蒸馏水, 每50.00 g粉末中加入0.25 g NaCl, 8 h后停止蒸馏, 所得精油置于4℃条件下保存。

#### 1.3.2 黑皮油松松针精油纳米乳液的制备

将一定质量的表面活性剂加入到精油中, 通过旋涡混合仪震荡混匀后, 所得到的乳液于120 MPa压力下经微射流处理3次, 即可得到纳米乳液, 经过一段时间静置, 通过分层体积来判断其稳定性。在制备过程中, 通过改变表面活性剂、助表面活性剂以及复配比例以获得不同的乳液。选择Cremophor EL(Cremophor EL 20、Cremophor EL 30和Cremophor EL 40)和Tween(Tween 40、Tween 60和Tween 80)2个系列作为表面活性剂的筛选, 然后选择较为温和的无水乙醇、正丁醇和丙三醇作为助表面活性剂的筛选。通过判断分层体积确定质量比(Km=5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1和1:2), 最后通过对复合表面活性剂与油的比值(S/O值=

9 : 1、8 : 2、7 : 3、6 : 4、5 : 5、4 : 6、3 : 7、2 : 8 和 1 : 9), 进行伪三元相图的绘制。

### 1.3.2.1 表面活性剂的筛选

参考王鲁慧等<sup>[12]</sup>的方法进行修改。取 1 号、2 号和 3 号带刻度试管, 先在 3 支试管中各加入 1.00 g 精油和 0.60 g 的无水乙醇, 然后在 1 号试管中加入 0.15 g Cremophor EL, 在 2 号试管中加入 0.15 g Tween, 在 3 号试管中加入 0.15 g 复合表面活性剂  $m(\text{Cremophor EL}) : m(\text{Tween}) = 1 : 1$ , 最后加蒸馏水定量至 3 mL。将所得乳液用旋涡混合仪震荡混匀, 再经微射流处理后分别静置 5、10、30 和 60 min, 观察并记录体系分层后下层清液的体积并绘制三元相图, 依分层体积和三元相图的乳化区面积判定其稳定性。

### 1.3.2.2 助表面活性剂的筛选

表面活性剂与助表面活性剂按照质量比 4 : 1 混匀后作为复合表面活性剂, 并进行稳定性判定, 从而确定最适助表面活性剂。亲水亲油平衡值(HLB 值)的测定: 将表面活性剂复配使用时, 复配体系的 HLB 值具有加和性, 复合表面活性剂的 HLB 值根据下面公式进行计算。当表面活性剂 HLB 值与油相 HLB 值较为接近时, 乳化效果较好。

$$HLB_{\text{MIX}} = \frac{HLB_{\text{C}} \times \omega_{\text{C}} + HLB_{\text{T}} \times \omega_{\text{T}}}{(\omega_{\text{C}} + \omega_{\text{T}})}$$

式中:  $HLB_{\text{C}}$  和  $HLB_{\text{T}}$  为表面活性剂 Cremophor EL 和 Tween 的 HLB 值;  $\omega_{\text{C}}$  和  $\omega_{\text{T}}$  为表面活性剂 Cremophor EL 和 Tween 的质量分数, %。

### 1.3.2.3 表面活性剂与助表面活性剂配比(Km)的确定

将最终筛选出的表面活性剂和助表面活性剂按质量比混匀后, 作为复合表面活性剂。按照 1.3.2.1 的方法制备精油乳液并记录其分层体积, 计算乳化区面积判定其稳定性, 从而确定最佳 Km 值。

### 1.3.2.4 纳米乳液最佳制备条件伪三元相图的绘制

以黑皮油松松针精油作为油相, 将油相与混合表面活性剂按照比例混匀, 制备出 9 种不同 S/O 值的混合溶液; 分别取 10 mL 置于三角瓶中, 室温下用旋涡混合器一边震荡一边滴加蒸馏水, 使其混合均匀, 期间会出现溶液由澄清变浑浊现象, 继续滴加蒸馏水, 直至溶液由浑浊变澄清, 且状态不再发生变化。记录临界点时加入蒸馏水的体积, 同时计算溶液中其它物质在该临界点时的质量分数。用 Origin 9.0 绘制纳米乳化区域。

## 1.3.3 纳米乳液的表征

### 1.3.3.1 纳米乳液的判定

纳米乳液的形成判定标准: 第一, 松针精油纳米乳化后形成的溶液是否澄清透明; 第二, 是否有蓝色或淡蓝色乳光; 第三, 平行光入射后是否产生丁达尔效应。

### 1.3.3.2 纳米乳液类型的测定

判定乳液类型的方法: 向乳液中同时滴加水溶性染料亚甲基蓝和油性染料苏丹红 III, 若苏丹红 III 染料在乳液中的扩散速度快于亚甲基蓝染料, 则为油包水型(W/O)乳液, 反之为水包油型(O/W)乳液, 若苏丹红 III 染料和亚甲基蓝染料在乳液中的扩散速度一样则为双连续型纳米乳液。

### 1.3.3.3 纳米乳液的形态、粒径以及多分散项系数(PDI)分析

取适量的精油纳米乳液样品, 在透射电镜下观察纳米乳液滴的形态。用 Zetasizer Nano-ZS 90 纳米粒度测定样品中粒子粒度及粒度分布。He/Ne 激光器的散射角为  $173^\circ$ , 波长为 633 nm。将约 1.2 mL 的待测样品装入聚苯乙烯比色皿中, 测试温度设定为  $(25.0 \pm 0.1)^\circ\text{C}$ , 平衡时间设为 2 min, 每个样品重复测定 3 次。但在乳液粒径测定时, 为避免多重散射的影响, 静置待样品池中气泡消除后, 乳液均经去离子水稀释 50 倍再进行测定。粒径大小及多分散项系数分别以  $d(\text{Diameter, nm})$  和 PDI (Polydispersity index) 表示。

## 1.3.4 黑皮油松松针精油纳米乳液的稳定性

### 1.3.4.1 储藏稳定性

将纳米乳液样品置于室温条件下储藏, 分别在储藏的第 10、20、30、40、50 和 60 天, 采用 1.3.3.3 的方法测定纳米乳液的粒径和 PDI 变化。

### 1.3.4.2 pH 稳定性

将制备好的纳米乳液分装于试管中, 使用 1 mol/L NaOH 或者 1 mol/L HCl 溶液调节 pH 至 3、4、5、6、7、8 和 9, 在室温放置过夜, 稀释 100 倍后, 测定纳米乳液的粒径和 PDI 变化。

### 1.3.4.3 温度稳定性

取 10 mL 纳米乳液于试管中, 分别在 40、50、60、70、80、90 和  $100^\circ\text{C}$  下水浴保温 60 min, 室温放置过夜, 稀释 100 倍后, 测定纳米乳液的粒径和 PDI 变化。

### 1.3.4.4 黑皮油松松针精油纳米乳液的抑菌性

采用二倍稀释法测定黑皮油松松针精油及其纳

米乳液的最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC),对其抑菌活性进行定量分析。将试管灭菌,进行编号,配制一系列梯度的纳米乳液溶液,加入液体培养基使总体积为4 mL,保持最终纳米乳液体积分数范围在0.125~0.128  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ,每个试管中再加入50  $\mu\text{L}$ 菌悬液,恒温震荡培养1 h;从试管中取50  $\mu\text{L}$ 涂布在平板上,密封培养24 h或48 h后拿出,观察各浓度培养皿上是否有菌生长。MIC值为培养24 h不长细菌时的纳米乳液浓度,MBC值为培养48 h不长细菌时的纳米乳液浓度。

#### 1.4 数据处理

每组数据均平行检测3次,结果取平均值。基础数据采用Excel软件处理,其余采用Origin 9.0处理,采用SPSS 21.0软件对显著性进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 黑皮油松松针精油纳米乳化体系的研究

#### 2.1.1 表面活性剂的筛选

经过预实验选择出了Tween 80和Cremophor EL 40作为制备松针精油纳米乳液表面活性剂的首

选,其余均不能形成稳定的乳化体系。3种表面活性剂的HLB值及乳化效果见表1。由表1可知,3种纳米乳化体系的分层体积随着静置时间的增加而增加。经过60 min的静置,以Tween 80为表面活性剂制备的纳米乳液分层体积最少(0.5 mL),且乳化区面积最大(25.504%);以Cremophor EL 40为表面活性剂制备的纳米乳液分层体积为0.8 mL,乳化区面积为21.500%;以Cremophor EL40和Tween 80复配的表面活性剂制备的纳米乳液分层体积为1.0 mL,乳化区面积为11.622%,小于单一表面活性剂的乳化区面积。这说明表面活性剂的两两复配并没有产生协同效应,未能达到提高纳米乳液稳定性的效果。复配表面活性剂之间可以产生协同作用主要有2个原因:一是多种表面活性剂可以提高乳化体系对水的增溶能力;二是表面活性剂分子通过分开界面增大了界面面积<sup>[13]</sup>。这2种复配表面活性剂乳化能力的降低可能是因为紧密结合的2种基团降低了表面活性剂亲水性能力。综上,选择Tween 80作为制备黑皮油松松针精油纳米乳液的表面活性剂。

表1 不同静置时间下表面活性剂对黑皮油松松针精油乳化效果的影响

Table 1 Effect of surfactants on emulsification of essential oil of *Pinus tabulaeformis* needles under different standing time

表面活性剂 Surfactant	亲水亲油平衡值 HLB	分层体积/mL Layered volume				乳化区面积/% Emulsification area
		5 min	10 min	30 min	60 min	
Cremophor EL 40	15.0	0.2	0.4	0.6	0.8	21.500
Tween 80	14.0	0.0	0.2	0.3	0.5	25.504
Cremophor EL 40/Tween 80	14.5	0.4	0.5	0.8	1.0	11.622

#### 2.1.2 助表面活性剂的筛选

不同助表面活性剂对黑皮油松松针精油乳化效果的影响见表2。3种纳米乳液经过60 min的静置,以无水乙醇为助表面活性剂的纳米乳液分层体积为0.3 mL,乳化区面积为25.504%,而正丁醇和丙三醇的乳化区面积小于无水乙醇的乳化区面积。Dun等<sup>[14]</sup>认为在水-油-表面活性剂-助表面活性剂共同形成的复杂体系中,2种活性剂首先混合形成双层膜,然后在油水界面上吸附。双层膜可以在油水界面弯曲,弯曲程度和方向的不同,纳米乳液的类型也不同。因此,在乳液形成过程中,2种活性剂的种类和添加量是重要的考虑因素。无水乙醇和Tween 80可以形成具有良好柔韧性的双层膜并稳

固的吸附在油水界面上。综上,选择无水乙醇作为制备黑皮油松松针精油纳米乳液的助表面活性剂。

#### 2.1.3 助表面活性剂与表面活性剂配比(Km)的确定

不同的Km值会影响纳米乳液的稳定性即分层体积和乳化区面积。当乳化体系的Km值一定,乳化体系的分层体积会随着时间的增长而增加,这说明稳定性会逐渐降低。当Km值为4:1时,静置60 min后分层体积最小且乳化区面积最大(表3)。其原因可能是当Km合适时,界面膜的弯曲弹性增加,表面张力增大,促进乳化体系的形成<sup>[15]</sup>。综上,选择Km为4:1即m(无水乙醇):m(Tween 80)=4:1,制备黑皮油松松针精油纳米乳液。

表 2 不同静置时间下助表面活性剂对黑皮油松松针精油乳化效果的影响

Table 2 Effect of cosurfactants on emulsification of essential oil of *P. tabulaeformis* needles under different standing time

助表面活性剂 Cosurfactants	分层体积/mL Layered volume				乳化区面积/% Emulsification area
	5 min	10 min	30 min	60 min	
无水乙醇 Anhydrous ethanol	0.0	0.1	0.2	0.3	25.504
正丁醇 N-butanol	0.1	0.3	0.5	0.7	18.210
丙三醇 Glycerol	0.1	0.3	0.6	0.9	15.646

表 3 不同静置时间下 Km 对黑皮油松松针精油乳化效果的影响

Table 3 Effect of Km on emulsification of essential oil of *P. tabulaeformis* needles under different standing time

Km	分层体积/mL Layered volume				乳化区面积/% Emulsification area
	5 min	10 min	30 min	60 min	
5 : 1	0.1	0.3	0.4	0.6	22.368
4 : 1	0.0	0.1	0.2	0.3	25.504
3 : 1	0.0	0.6	0.8	1.0	17.236
2 : 1	0.0	0.4	0.6	0.7	14.335
1 : 1	0.1	0.3	0.4	0.5	13.571
1 : 2	0.1	0.5	1.0	1.4	9.767

### 2.1.4 纳米乳液最佳制备条件

对复合表面活性剂与油的比值(S/O 值=9 : 1、8 : 2、7 : 3、6 : 4、5 : 5、4 : 6、3 : 7、2 : 8 和 1 : 9)进行三元相图的绘制(图 1)。三元相图中阴影面积为纳米乳化区,3 条边分别表示了纳米乳液中复合表面活性剂、精油和水的含量即 3 种物质在纳米乳液中所占百分比,图中黑点表示 S/O 的值。在伪三元相图中,通过 Origin 软件自动选取纳米乳化区面积中央的 1 点即为纳米乳液的最佳配方(ME),将 ME 点所在位置分别向三条边延长所对应的 3 项值即松针精油 16.14%、复合表面活性剂 10.45%和蒸馏水 73.41%为纳米乳液最佳配方。

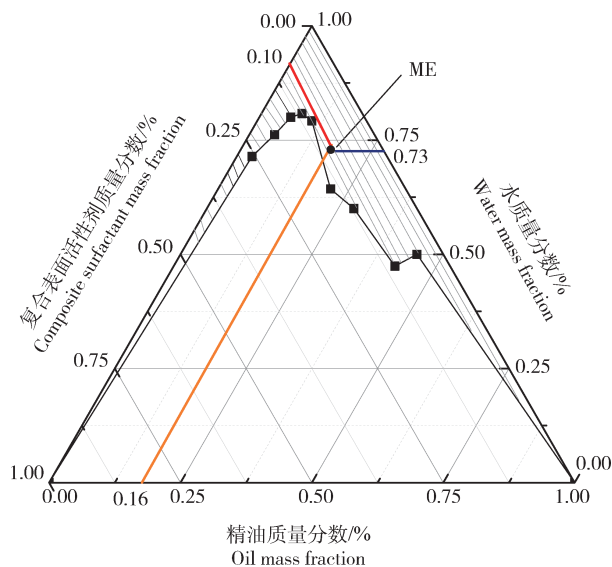
## 2.2 纳米乳液的表征

### 2.2.1 纳米乳液的判定

由图 2(a)可见,纳米乳液澄清透明,有微弱的淡蓝色光,且乳液可以与水以任意比例混合。胶体产生丁达尔效应的原因是入射光的波长>胶体粒子直径。由图(b)可见,经过平行光入射后有丁达尔效应发生,由清晰的红色射线可知所制备的纳米乳液外观均一、透明且性质稳定。综上,该制备方法可形成纳米乳液。

### 2.2.2 纳米乳液类型的测定

通过染色法鉴定精油纳米乳液的类型,向纳米



图中黑点表示 S/O 的值。ME 为软件自动选取的纳米乳液最佳配方。彩线表示纳米乳液最佳配方对应的每种成分的最佳含量。

The black dot in the figure represents the value of S/O. ME is the best formulation of nano emulsion for automatic selection of software. Color line represents the best content of each component in the best formula of nano emulsion.

图 1 黑皮油松松针精油纳米乳液最佳制备条件的伪三元相图

Fig. 1 Pseudo three phase diagram of optimum preparation conditions for *Pinus tabulaeformis* needles essential oil nanoemulsion

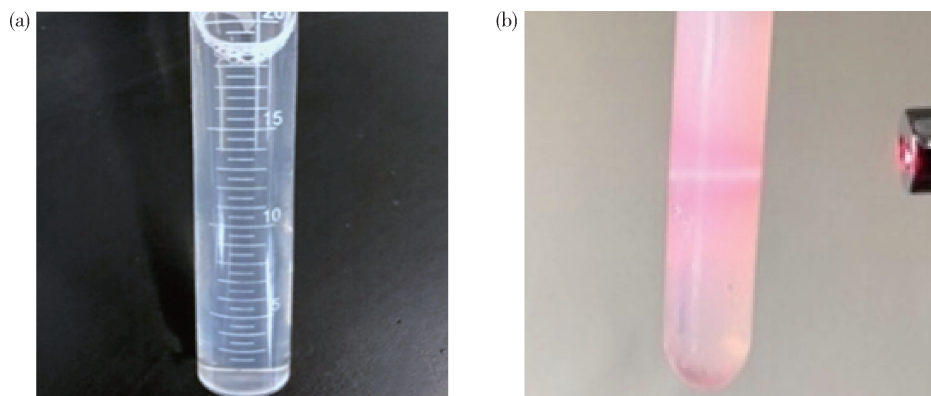


图2 黑皮油松松针精油纳米乳液的外观(a)和丁达尔效应(b)

Fig. 2 The appearance (a) and Dindal effect (b) of *P. tabulaeformis* needles essential oil nanoemulsion

乳液中同时滴加油溶性染料苏丹红 III 和水溶性染料亚甲基蓝,亚甲基蓝在乳液中的扩散速度明显快于苏丹红 III,由此可判定所制备的乳液为 O/W 型纳米乳液。



图3 苏丹红 III(左)和甲基蓝(右)在纳米乳液中扩散情况  
Fig. 3 Diffusion of sudan III (left) and methyl blue (right) in nanoemulsion of EOPTN

### 2.2.3 纳米乳液的形态、粒径以及分布

将松针精油纳米乳液经过 50 倍稀释后,通过透射电子显微镜观察到其液滴形态(图 4)。在显微镜下可以直观的观察纳米颗粒的形状和分布。松针精油纳米乳液滴呈现球圆形,并且分布均匀,说明此纳米乳液分散较好。

粒径的大小不仅可以评判纳米乳液是否形成,而且也是衡量纳米乳液稳定性好坏的标准。采用纳米粒度仪测定所制备纳米乳液的粒径分布如图 5,可以看出松针精油纳米乳液滴的粒径分布窄且呈单

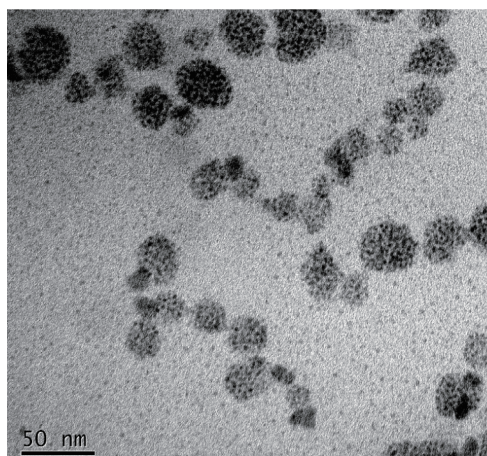


图4 黑皮油松松针精油纳米乳液透射电镜照片  
Fig. 4 Transmission electron micrograph of nanoemulsion of EOPTN

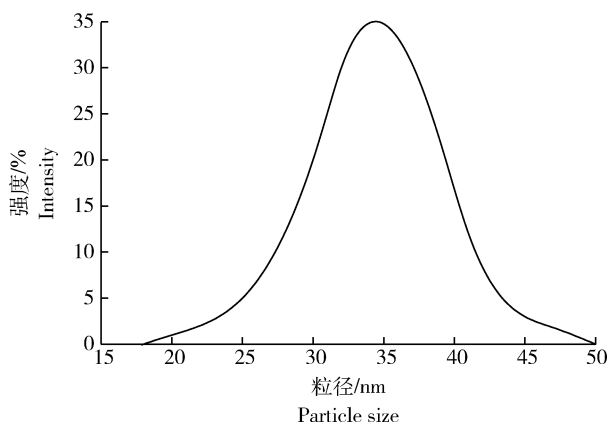


图5 黑皮油松松针精油纳米乳液粒径分布图  
Fig. 5 The droplet-size distribution curve for nanoemulsion of EOPTN

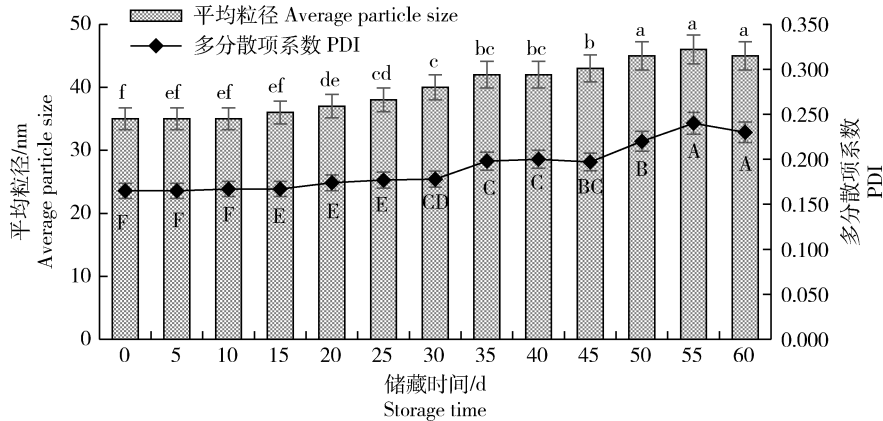
峰,说明液滴粒径一致性好。经纳米粒度检测报告显示平均粒径在 35 nm, PDI 为 0.165。有研究表明当  $PDI < 0.300$  时, 纳米乳液较稳定<sup>[16]</sup>。综上, 纳米乳液有较好的品质。

#### 2.2.4 纳米乳液的稳定性

##### 2.2.4.1 黑皮油松松针精油纳米乳液的储藏稳定性

由图 6 可知, 在储藏 30 d 时, 纳米乳液的 PDI

与第 0 天相比增加 0.013, 但粒径仅增大 5 nm, 说明在 30 d 内, 纳米乳液保持较好的流动性和一定的透明度。当储藏天数继续增加, PDI 开始波动明显, 与第 0 天相比增加 0.065, 粒径增加 10 nm。在储藏至 60 d 时, 纳米乳液未发生油水分离和絮凝等现象。综上, 本研究制备的纳米乳液在 60 d 之内有良好的储藏稳定性, 且最佳储藏时间为 30 d。



不同大写字母表示 PDI 差异显著 ( $P < 0.05$ ); 不同小写字母表示平均粒径差异显著 ( $P < 0.05$ )。下同。

Different capital letters indicated significant difference in PDI ( $P < 0.05$ ), and different lowercase letters indicated significant difference in average particle size ( $P < 0.05$ ). The same below.

图 6 黑皮油松松针精油纳米乳液平均粒径和 PDI 变化

Fig. 6 Changes in the mean droplet size and PDI for nanoemulsion of EOPTN

##### 2.2.4.2 黑皮油松松针精油纳米乳液的 pH 稳定性

由图 7 可知,  $pH < 7$  或  $> 7$  时, 纳米乳液的粒径和 PDI 均有小幅增加;  $pH = 7$  时, 粒径和 PDI 最小。

当  $pH$  在 3~9 时, 纳米乳液的粒径仅变化 4 nm, PDI 变化 0.024, 属正常范围<sup>[21]</sup>。因此, 本研究制备的纳米乳液有良好的 pH 稳定性。

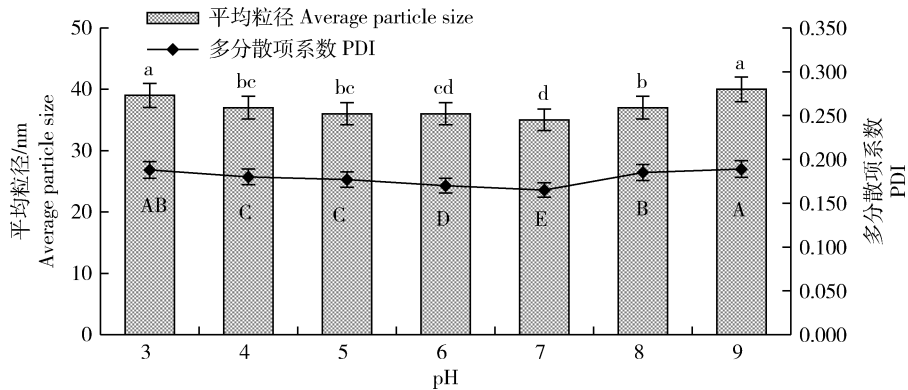


图 7 pH 对黑皮油松松针精油纳米乳液的平均粒径和 PDI 的影响

Fig. 7 Effect of pH value on the average size and PDI of nanoemulsion of EOPTN

##### 2.2.4.3 黑皮油松松针精油纳米乳液的温度稳定性

由图 8 可知, 当温度低于 70 °C 时, 纳米乳液的粒径在 35~40 nm, PDI 变化幅度小, 纳米乳液仍然保持澄清透明略带蓝光的状态; 在加热到 80 °C 时,

纳米乳液的粒径增幅变大, PDI 急速上升, 此时纳米乳液开始出现浑浊现象, 说明此时起层现象出现; 将已经浑浊的乳液置于室温中冷却, 又恢复到之前澄清透明的状态。综上, 本研究制备的纳米乳液

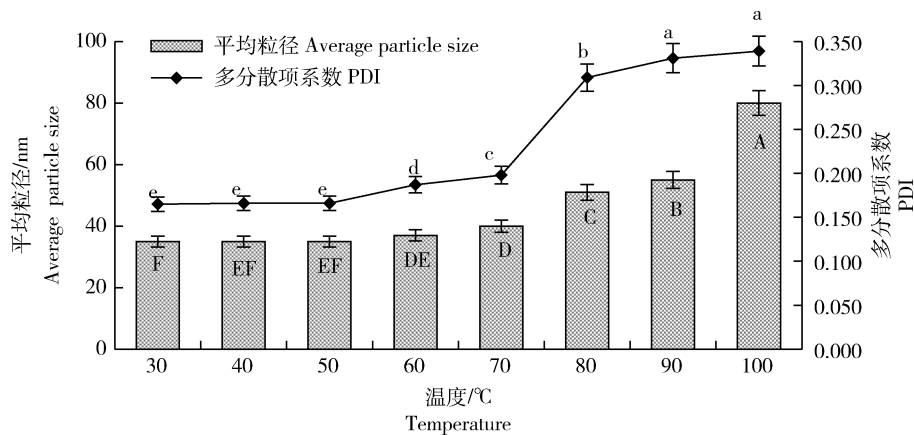


图8 温度对黑皮油松针精油纳米乳液的平均粒径和PDI的影响

Fig. 8 Effect of temperature on the average size and PDI of nanoemulsion of EOPTN

体系具有良好的温度稳定性, 昙点温度为 80 °C 左右。

#### 2.2.4.4 黑皮油松松针精油纳米乳液的抑菌效果研究

由表4可知, 未乳化的精油和其纳米乳液对测试菌均有抑制效果, 黑皮油松松针精油对 *E. coli* 的 MIC 为 1.6  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , MBC 为 3.2  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , 对 *S. aureus* 的 MIC 为 3.2  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , MBC 为 6.4  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ; 但是其纳米乳液体系对 2 种测试菌抑制效果优于未乳化的精油抑菌效果, 对 *E. coli* 和 *S. aureus* 的 MIC 分别为 0.8 和 1.6  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , MBC 分别为 1.6 和 3.2  $\mu\text{L}/\text{mL}$ 。

在相同的精油浓度以及其他外界因素一致的情况下, 精油纳米乳液对 2 种供试菌抑菌效果均比精

油抑菌效果好。这可能是因为纳米乳液通过运输活性物质, 精油在水中的溶解性和稳定性均明显提升, 增加了分散性, 提高了比表面积, 并且可以与细菌细胞膜相互作用导致细胞裂解。Donsì 等<sup>[17]</sup>研究表明将萜烯混合物和 d-柠檬烯混合封装于食品级配料的纳米乳液, 对大肠杆菌抗菌活性的增加主要取决于表面活性剂和输送系统的平均直径。当纳米乳液和输送系统的直径相似时, 细胞出现被动吸收现象, 从而减小了阻力, 梨汁中加入纳米级的萜烯后, 可以保护梨汁的品质不被破坏。由此可见, 经过纳米乳化后的精油体系抑菌效果更好, 可能是因为纳米乳液粒径较小, 更易破坏细菌细胞膜, 增强了乳化体系的抑菌效果。

表4 黑皮油松松针精油纳米乳液的最小抑菌浓度和最低抑菌浓度

Table 4 MIC and MBC of EOPTN nanoemulsion

$\mu\text{L}/\text{mL}$

菌种 Strain	最小抑菌浓度 MIC		最小杀菌浓度 MBC	
	精油 EO	纳米乳液 Nanoemulsion	精油 EO	纳米乳液 Nanoemulsion
大肠杆菌 <i>E. coli</i>	1.6	0.8	3.2	1.6
金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	3.2	1.6	6.4	3.2

## 3 讨论

### 3.1 对前人研究结果有所突破、创新的阐释

本研究通过分层体积和三元相图的乳化区面积 2 种指标来筛选表面活性剂和助表面活性剂以及两者配比, 制备了稳定的黑皮油松松针精油纳米乳液。周汉军<sup>[18]</sup>对桉叶精油的乳化体系进行了研究, 只以分层体积作为筛选的指标, 发现 Cremophor 系列更

适合制备桉叶精油的乳化体系; 陶紫<sup>[19]</sup>在香茅草精油微乳体系的构建中, 利用伪三元相图的微乳区面积发现 Tween 80 具有更好的乳化效果。这说明不同来源的精油在构建乳化体系的时候, 最适表面活性剂和助表面活性剂的选择也不同。目前对乳化体系配方的筛选有分层体积和伪三元相图的乳化区面积等, 本研究将 2 种指标相结合使实验更具说服力。是否还有其他判定纳米乳液体系的配方指标将是下



一步研究的重点。

### 3.2 研究需要说明的问题及前沿展望

黑皮油松是松科松属植物中比较容易获得的树种,资源丰富,且它的松壳和松果等已被国内外学者证实具有很多活性成分,因此其开发的安全性和可行性都比较高。研究表明黑皮油松松针精油具有良好的抑菌活性和抗氧化作用,但是由于不溶于水且活性成分易挥发限制了其开发利用。本研究将黑皮油松松针精油制备成黑皮油松松针精油纳米乳液,试验结果表明此纳米乳液与未经乳化的精油相比稳定性和抑菌性都得到了一定的提高。但在此试验中只研究了大肠杆菌和金黄色葡萄球菌,在实际应用中会涉及到其他的菌如白色念珠菌(*Candida albicans*)。在之后的试验中会继续研究黑皮油松松针精油纳米乳液对其他菌种的抑菌效果,使试验更具有广泛性和严谨性。据报道,精油的抑菌机理主要包含细胞壁和细胞膜结构的破坏、胞体脂肪体的溶解、细胞膜正常功能的紊乱、对 DNA 和 RNA 等遗传物质的合成抑制、对脂质层的稳定的影响等和对能量代谢及还原酶体系的影响<sup>[20]</sup>。Michael 等<sup>[21]</sup>对精油中的主要成分萜类化合物进行了研究,结果表明,该萜类化合物在 NADH 即还原型辅酶辅因子的使用和反应收率方面是高效的,并对电子传递也有一定影响。因此黑皮油松松针精油纳米乳液的抗菌机理有待进一步研究和总结。本研究解决了黑皮油松松针精油水溶性差、利用率低、储藏和加工过程中易发生氧化变质等加工、贮藏和应用方面的难题,在保证黑皮油松松针精油活性成分不损失的同时,扩大了其作为天然抑菌剂等功能性辅料在食品领域的应用范围。

## 4 结 论

本研究得到制备黑皮油松松针精油纳米乳液的最佳配方为松针精油 16.14%、复合表面活性剂 10.45%( $m(\text{无水乙醇}) : m(\text{Tween 80}) = 4 : 1$ )和蒸馏水 73.41%,制备的纳米乳液粒径平均为 35 nm, PDI 为 0.165,具有良好的稳定性和抑菌性。

## 参考文献 References

[1] 张云奕, 庄岩, 魏文峰, 曹贵阳, 李想. 黑皮油松及樟子松松针挥发油成分 GC-MS 分析[J]. 中国中医药科技, 2018, 25(6): 819-822, 830

Zhang Y Y, Zhuang Y, Wei W F, Cao G Y, Li X. Analysis on volatile oil composition in pine needle of *pinus tabulaeformis* var *mukdensis* and *pinus sylvestris* var *mongolica* by GC-MS [J]. *Chinese Journal of Traditional Medicine Science and Technology*, 2018, 25(6): 819-822, 830 (in Chinese)

[2] 包怡红, 刘文丽. 黑皮油松松针精油的超声波辅助-盐析-水蒸气蒸馏法提取及其抑菌效果和稳定性[J]. 东北林业大学学报, 2018, 46(10): 54-58

Bao Y H, Liu W L. Extraction of *pinus tabulaeformis* needles essential oils by ultrasoni-assisted salting-out hydrodistillation and its antibacterial effect and stability [J]. *Journal of Northeast Forestry University*, 2018, 46(10): 54-58 (in Chinese)

[3] Jawad J, Fereshteh J K, Akram R, Morteza Y. Antioxidant, cytotoxic and antibacterial activity of *rosmarinus of ficinalis* L essential oil against bacteria isolated from urinary tract infection [J]. *European Journal of Integrative Medicine*, 2020, 38(10): 101192

[4] Nirmal N P, Mereddy R, Li L, Sultanbawa Y. Formulation, characterisation and antibacterial activity of lemon myrtle and anise myrtle essential oil in water nanoemulsion [J]. *Food Chemistry*, 2018, 173(6): 1-7

[5] Orlando C, Giulia G, Maryne L, Thomas M, Vincenzo P. Essential oil-based nano-emulsions: effect of different surfactants, sonication and plant species on physicochemical characteristics [J]. *Industrial Crops & Products*, 2020, 157(4): 112935

[6] Raviadarar R, Han N M, Chandran D, Ooi K, Manickam S. Stable W/O/W multiple nanoemulsion encapsulating natural tocotrienols and caffeic acid with cisplatin synergistically treated cancer cell lines (A549 and HEP G2) and reduced toxicity on normal cell line (HEK 293) [J]. *Materials Science & Engineering C*, 2021, 121(2): 111808

[7] Adel M H, Soleiman A. Nano-emulsification of orange peel essential oil using sonication and native gums [J]. *Food Hydrocolloids*, 2015, 44(8): 40-48

[8] 张培旗, 王世豪, 纵伟. 高压微射流制备生姜精油纳米乳化酱油的工艺研究[J]. 中国调味品, 2020, 45(8): 92-94, 104

Zhang P Q, Wang S H, Zong W. Preparation of soy sauce nanoemulsion with ginger essential oil by high-pressure microfluidization process [J]. *China Condiment*, 2020, 45(8): 92-94, 104 (in Chinese)

[9] Lewińska A, DomżałKędzia M, Jaromin A, Łukaszewicz M. Nanoemulsion stabilized by safe surfactin from bacillus subtilis as a multifunctional, custom-designed smart delivery system [J]. *Pharmaceutics*, 2020, 12(10): 953-954

[10] Nazia T, Mohammad A K. Thyme essential oil incorporated into alginate based edible coatings for shelf-life extension of fresh-cut papaya [J]. *International Journal of Processing and Post harvest Technology*, 2019, 10(1): 16-22

[11] 宗芳芳, 包怡红, 李德海, 郭宏鑫, 徐颖, 顾嘉林. 盐析辅助

- 水蒸气蒸馏法制备红松壳挥发油研究[J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2016, 40(6): 122-128
- Zong F F, Bao Y H, Li D H, Guo H X, Xu Y, Gu J L. The preparation and component analysis of pine shell volatile oil by salting out-assisted steam distillation[J]. *Journal of Nanjing Forestry University: Natural Sciences Edition*, 2016, 40(6): 122-128 (in Chinese)
- [12] 王鲁慧, 黄国清, 于春娣, 肖军霞. 番茄红素油多层乳状液的制备及稳定性研究[J]. 中国食品学报, 2019, 19(2): 139-146
- Wang L H, Huang G Q, Yu C D, Xiao J X. Studies on the preparation of lycopene multilayered emulsion and stability evaluation[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2019, 19(2): 139-146 (in Chinese)
- [13] Allen L V. Basics of compounding: excipients used in nonsterile compounding, part 7: compounding with surfactants [J]. *International Journal of Pharmaceutical Compounding*, 2020, 24(5): 388-395
- [14] Dun H Y, Liang H H, Zhan F C, Wei X L, Chen Y Y, Wan J W, Ren Y Y, Hu L, Li B. Influence of O/W emulsion on gelatinization and retrogradation properties of rice starch[J]. *Food Hydrocolloids*, 2020, 103(9): 105652
- [15] 郭静, 蒋建国, 韦林洪, 薛梅, 夏亲, 闫晓童, 刘天晴. 橄榄油微乳体系的相行为及影响因素研究[J]. 食品工业科技, 2019, 40(7): 35-40
- Guo J, Jiang J G, Wei L H, Xue M, Xia Q, Yan X T, Liu T Q. Study on phase behavior and influence factors of Olive oil microemulsion[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2019, 40(7): 35-40 (in Chinese)
- [16] 郗泽文, 成策, 彭盛峰, 邹立强, 刘伟. 柠檬精油乳液可食用涂膜液对冷藏卤鸭脖的保鲜效果[J]. 食品科学, 2020, 41(1): 237-243
- Xi Z W, Cheng C, Peng S F, Zou L Q, Liu W. Effect of lemon essential oil emulsion edible coating on quality preservation of refrigerated pot-stewed duck neck [J]. *Food science*, 2020, 41 (1): 237-243 (in Chinese)
- [17] Donsi F, Marianna A, Mariarenata S, Giovanna F. Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods[J]. *LWT - Food Science and Technology*, 2011, 44(9): 1908-1914
- [18] 周汉军. 桉叶精油提取、纳米乳化及其抑菌活性研究[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2016
- Zhou H J. The research on extraction, nanoemulsification and antibacterial activity of essential oil of eucalyptus leaves[D]. Changsha: Central South University of Forestry and Technology, 2016 (in Chinese)
- [19] 陶紫. 香茅草精油微乳体系的构建及其抗氧化和抗肿瘤细胞活性的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2018
- Tao Z. Preparation and optimization of *cymbopogon citratus* (DC) *stapf* essential oil microemulsions and research on its antioxidant/ antitumor activities[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2018 (in Chinese)
- [20] Wang L C, Li L S, Xu N, Sun W Q, Ding B M, Xu W, Li Z S. Effect of carboxymethylcellulose on the affinity between lysozyme and liposome monolayers: evidence for its bacteriostatic mechanism[J]. *Food Hydrocolloids*, 2020, 98 (1): 105263.1-105263.8
- [21] Michael H, Harald Sr, Volker S. Biocatalytic synthesis of a diketobornane as a building block for bifunctional camphor derivatives[J]. *ChemCatChem*, 2013, 5(11): 3351-3357

责任编辑: 董金波