利用两性小分子甘草酸制备乳液凝胶及其性质分析

孙颖恩[1]，万芝力[1]，杨晓泉[1,2]
（1.华南理工大学食品科学与工程学院食物蛋白工程研究中心，广东广州 510640）
（2.广东省天然产物绿色加工与产品安全重点实验室，广东广州 510640）

摘要：液态油脂结构化研究目前是现代食品加工业的热点问题。本文利用三萜化合物甘草酸铵作为天然结构化材料，将液态植物油结构化形成乳液凝胶（Emulsion gel）。该乳液凝胶油含量高，且制备方法简单温和。利用激光共聚焦显微镜和偏光显微镜观察的微观结构显示，在较高的甘草酸铵浓度和油含量下，作为活性填充颗粒的油滴紧密堆积在凝胶网络中，强化了凝胶结构。流变学测试结果也显示，在相同甘草酸铵浓度下，制备的乳液凝胶强度显著高于相应浓度的水凝胶。另外，荷载 β-胡萝卜素对凝胶结构性质影响不明显，而且乳液凝胶保持良好的稳定性，表明该乳液凝胶具备作为油溶性生物活性物质输送体系的潜力。研究结果显示，利用两性小分子甘草酸铵作为天然结构化材料制备的乳液凝胶在功能性食品和药品等领域都具有宽阔的应用前景。

关键词：油脂结构化；乳液凝胶；甘草酸；流变性质；微观结构
文章篇号：1673-9078(2017)6-100-104 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.6.015

Preparation and Characterization Analysis of Novel Emulsion Gels Using Amphiphilic Small Molecule Glycyrrhizic Acid

SUN Ying-en[1], WAN Zhi-li[1], YANG Xiao-quan[1,2]
(1.Research and Development Center of Food Proteins, Department of Food Science and Technology, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China) (2.Guangdong Province Key Laboratory for Green Processing of Natural Products and Product Safety, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Edible lipid oil structuring is a hot topic in the modern food processing industry. In this study, triterpenoid glycyrrhizic acid (GA) was used as a natural structuring agent to transform vegetable oil into emulsion gels. The emulsion gels stabilized with GA contained a high content of oil and the preparation procedure was simple and mild. The microscopic structures observed using laser confocal microscopy and polarized light microscopy showed that at high GA and oil concentrations, the oil droplets that served as active filler particles were found to be closely packed in the gel network, thus strengthening the gel structure. The rheological results showed that at the same GA concentration, the gel strength of the emulsion gel was significantly higher than that of the hydrogel. In addition, the incorporation of β-carotene did not affect the gel structure significantly, and a good stability was maintained in the emulsion gel, indicating that GA-based emulsion gels could be used as a potential oil-soluble delivery system for bioactive ingredients. These findings suggested that emulsion gels prepared from the amphiphilic small molecule GA could have a broad range of applications in functional foods, pharmaceuticals, and other fields.

Key words: oil structuring; emulsion gels; glycyrrhizic acid; rheological properties; microstructure

近年来，液态油脂结构化研究成为现代食品加工业的热点问题，同时其在药物输送、化妆品稳定性改善和润滑油领域的应用前景也备受关注[1~4]。传统的结构化液态食用油主要是利用甘油三脂晶体作为结构单元来构建，这将不可避免地在食品中引入反式脂肪酸（*trans*-fatty acids）。最近美国食品和药品管理局（FDA）决定把部分氢化油（Partially hydrogenated oils，PHOs）移除“普遍认为安全（GARS）”名单，并将于2018年6月之前全面禁止在美国食物中使用人造反式脂肪酸，以降低心脏疾病的发病率。因此，食品制造商致力于寻找替代原有食品中反式脂肪酸和部分饱和脂肪酸的新型液态油替结构化方法[5]。目前，油胶（Oleogels）是最为常用的油脂结构化手段，常用的材料为蜡[6]、脂肪酸及脂肪醇[7]和卵磷脂[8]等小分子物质。另外一种有效的手段是制备结构化乳液体系（Structured emulsions）；与油胶相比，更多的生物大

收稿日期：2016-07-08
基金项目：国家自然科学基金资助项目（31130042）；国家自然科学基金面上项目（31371744）
作者简介：孙颖恩（1991-），女，硕士研究生，研究方向：植物蛋白工程
通讯作者：杨晓泉（1965-），男，博士，教授，研究方向：植物蛋白质的开发与利用

分子物质如蛋白质和多糖等可以用于构建结构化乳液体系[9]，而单甘酯（Monoglycerides）是唯一常用于水包油乳液体系中的小分子结构化助剂[10]。由于油脂结构化在不同领域都具有很大的应用潜力，因此有必要寻找天然、可持续的食品级材料用于液态油脂结构化。

甘草酸（Glycyrrhizic acid，GA）是甘草提取物的主要成分，是一种天然三萜皂苷类化合物。由于其甜度高（是蔗糖甜度的 50 倍），被广泛用于糖果和甜品等食品中。此外，甘草酸还具有很多生理功效，如抗炎、抗肿瘤和抗菌。从化学结构上来说，甘草酸单体分子是由一个疏水三萜糖苷配基（18β-甘草次酸）和两个葡萄糖醛酸组成，是一种典型的两亲性分子结构。由于其分子结构的两亲性，甘草酸在水相中显示出复杂的自组装行为[11,12]。甘草酸在水中可通过自组装形成长纳米纤维，随着浓度提高能进一步形成具有纤维网络结构的超分子水凝胶[11]。另外，甘草酸分子也显示对一些有机溶剂进行结构化形成有机凝胶（Organogels）的能力。目前，国内外未见有关利用甘草酸用于液态植物油结构化的相关报道，这主要是因为甘草酸分子在油中的溶解度非常低，因此不能直接对植物油进行结构化。尽管如此，作为两亲性分子，甘草酸对疏水性油相也具有一定的亲和力，可用于稳定油-水界面而作为乳化剂使用。基于这些性质，我们推测可利用甘草酸作为结构化单元来构建结构化乳液体系。

本文通过简单的一步乳化法，成功制备了甘草酸基乳液凝胶。首先，在加热条件下乳化得到甘草酸稳定的水包油乳液，然后冷却至室温诱导乳液凝胶的形成。进一步通过表征乳液凝胶的微观结构、流变学性质及荷载能力，理解甘草酸稳定的乳液凝胶的结构性质以及其在食品和药品等领域的应用潜力。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

甘草酸铵，纯度 98%以上，购于 Acros Organics 公司；橄榄油，西班牙 EXIOM 食品公司生产，购自本地超市；荧光染料尼罗红（Nile red）购于美国西格玛奥德里奇公司；其他化学试剂均为分析纯；所有实验用水均为去离子水。

1.2 仪器与设备

电热恒温水浴锅，江苏金坛市宏华仪器有限公司；Ultra-Turrax T10 均质机，德国 IKA 公司；Axioskop 40 Pol/40A Pol 偏光显微镜，德国 ZEISS 公司；激光共聚焦显微镜，德国 Leica 公司；HAKKE RS600 流变仪，德国 Thermo 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 甘草酸铵（GA）乳液凝胶的制备

准确称取一系列质量的 GA 粉末溶于去离子水中，80 ℃水浴加热 10 min，以充分溶解得到透明溶液。将橄榄油分散至 GA 溶液中，混合物分别直接均质和水浴加热 2 min 后均质。均质速度为 11500 r/min、14500 r/min、20500 r/min 和 30000 r/min。室温静置冷却，得到甘草酸铵浓度为 0.5~4wt%，油含量为 60%的乳液凝胶。为了了解乳液凝胶对活性物质的荷载能力，在均质前将 β-胡萝卜素（油含量 0.1wt%）分散在橄榄油中，再利用同样的条件制备样品。

1.3.2 流变学测定

将凝胶样品置于直径为 27.83 mm 的平板测量台上，间隙设为 1 mm，测定温度为 25 ℃。首先测定样品随应力变化（0.1~1000 Pa）的弹性模量（G'）及粘性模量值（G"），确定凝胶流变学响应的线性粘弹区域；然后确定在应力为 1 Pa（凝胶的线性粘弹性区域内）时，再对样品进行频率扫描（0.1~100 rad/s），记录 G'和 G"随频率变化的趋势。

1.3.3 甘草酸铵乳液凝胶微结构测定

1.3.3.1 偏光显微镜

取凝胶样品于平板载玻片上，盖玻片压紧备用。观察时放大倍数为 500×(50×10)，采集偏光图像。

1.3.3.2 激光共聚焦显微镜

采用莱卡激光共聚焦显微镜观测乳液凝胶的微观结构。将 0.1wt% Nile Red 加入橄榄油中，充分混合均匀后用于制备乳液凝胶。取样品于单凹载玻片样品池中，确保样品中没有气泡，盖玻片压紧备用。用 100×油镜观察样品区域及层面，选择 488 nm 的 Ar 离子激光预扫描，采集共聚焦图像。参数确定后开始扫面，采集图像，保存图像。用 LAS AF Lite 软件进行图像分析与数据处理。

1.3.4 数据分析

实验数据通过数据分析系统软件（SAS 软件）经过单因素方差分析并在结果之间进行相关性统计。显著性分析通过 Duncan 的多范围检验（Duncan's multiple range test）得到，p<0.01 表示极显著，p<0.05 表示显著，p>0.05 表示不显著。

2 结果与讨论

2.1 GA 乳液凝胶的制备

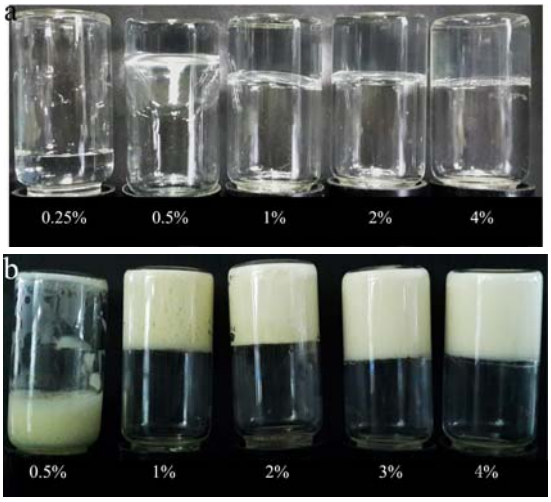


图 1 (a)GA 溶液（0.25～4 wt%）在室温（25 ℃）放置过夜后形成的透明水凝胶倒置外观图；(b) GA 浓度为 0.5~4 wt%时制备的乳液凝胶（油含量为 60%）倒置外观图

Fig.1 (a) Photographs (in an inverted position) of GA solutions (0.25~4 wt%) after overnight storage at room temperature (25 °C) showing transparent hydrogel formation at the low GA concentration of 0.5 wt%; (b) Photographs (in an inverted position) of emulsion gels containing 60 wt% olive oil prepared at varying GA concentrations (0.5~4 wt%)

据报道[11]，GA 在水中具有复杂的自组装行为，其通过各向异性自组装首先形成纳米纤维结构，随着浓度的进一步增加，纤维之间通过非共价作用力（氢键和疏水相互作用等）进行进一步缠绕而形成三维网络，最终形成超分子水凝胶。从图 1a 可以看到，当 GA 浓度为 0.5%时，能够形成水凝胶。因此，选择 0.5%作为最小 GA 浓度来制备乳液凝胶。从图 1b 看到，当 GA 浓度为 0.5%时，虽然单独的 GA 能够形成水凝胶，但室温冷却后的乳液仍然呈流动状态，不能形成凝胶。随着 GA 浓度的提高（1~4%），可以看到冷却后的乳液都能形成凝胶。这些现象表明利用 GA 分子的两亲性和自组装能力，能够通过热均质形成乳液然后再将乳液冷却的方法制备 GA 基乳液凝胶。

图 2a 是 GA 溶液与橄榄油均质前加热与不加热条件下乳液凝胶的小振幅动态频率扫描图。由图可知，橄榄油经过加热后再进行均质能够提高乳液凝胶的强度。因为 GA 凝胶的形成对环境温度十分敏感，是一个热力学平衡过程。体系温度的降低会促进甘草酸铵的自组装，影响在均质过程中对油脂的乳化能力。图 2b 为不同均质速度下乳液凝胶的小振幅动态频率扫描图。由图可以看出，在均质速度为 11500~20500 r/min 范围内，乳液凝胶的弹性模量随着均质速度的提高而增加。这是由于均质速度的提高能够使液态油脂更加均匀地分散在甘草酸铵溶液中，油滴能够更好地被包埋或整合进凝胶网络，使形成的乳液凝胶结构更加紧密。因此后续实验的样品均在均质前加热 2 min，均质速度为 20500 r/min。

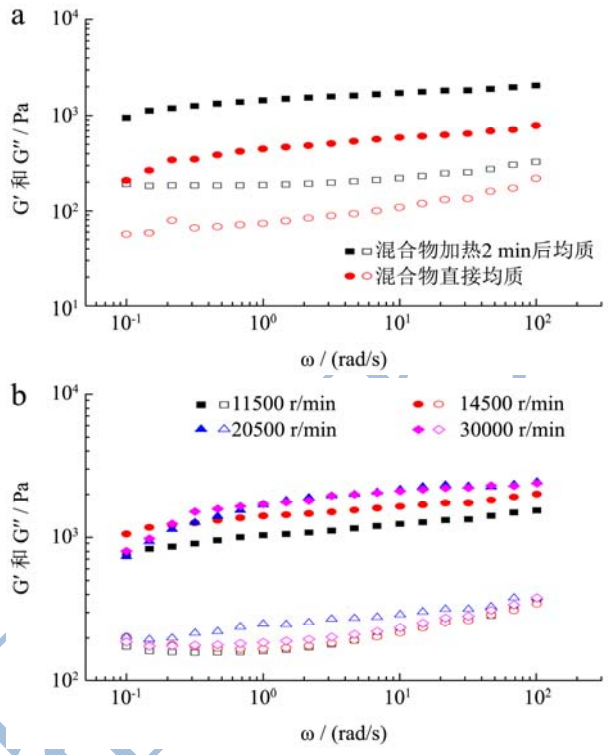


图 2 (a)均质前加热与不加热制备乳液凝胶（GA 浓度为 2wt%，油含量为 60%）的频率扫描图；(b) 不同均质速度下制备乳液凝胶（GA 浓度为 2wt%，油含量为 60%）的频率扫描图

Fig.2 Frequency sweeps for emulsion gels containing 2 wt% GA and 60 wt% olive oil (a) with and without incubation at 80 °C and (b) at different homogenizing rates

注：G′和 G″分别用实心和空心图形表示。

2.2 GA 凝胶的流变学性质

乳液凝胶的结构与其小变形流变学行为密切相关，因此借助小幅振荡流变测量建立乳液结构与其流变学特性之间的关系。从图 3 振幅扫描看到，在线性粘弹区域内所有样品的弹性模量 G′均高于粘性模量 G″，说明 GA 水凝胶与乳液凝胶均表现出弹性类固体结构性质。随着振幅的增加，屈服点（G″>G′）出现，这表明在更高的应力作用下样品由于内部结构的变化产生非线性响应。随着 GA 浓度的提高，GA 水凝胶和乳液凝胶都具有更宽的线性粘弹区、更高的临界应力及 G′值；这说明 GA 浓度的提高有利于更多的 GA 分子参与到网络结构的构建，从而形成强度更大的凝胶结构。可注意到，与 GA 水凝胶相比（图 3a），GA 乳液凝胶（图 3b）的凝胶强度显著高于相应的水凝胶，而且具有更宽的线性粘弹区和更高的临界应力。这些结果说明 GA 稳定的油滴可作为活性填充颗粒填充在

网络中，与凝胶网络密切相连，因而强化了凝胶网络结构[9]。

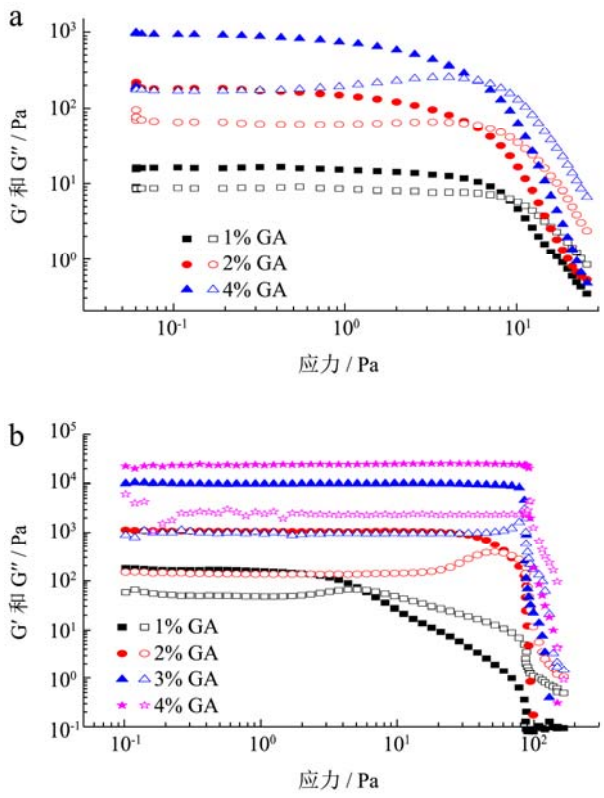


图 3 （a）不同 GA 浓度（1~4wt%）水凝胶的振幅扫描图；（b）不同 GA 浓度（1~4wt%）乳液凝胶（油含量为 60%）的振幅扫描图

Fig.3 Amplitude sweeps for (a) GA hydrogels and (b) emulsion gels containing 60 wt% olive oil prepared at different GA concentrations (1~4 wt%)

注：G′和 G″分别用实心和空心图形表示。

为了探究乳液凝胶的流变学响应对扫描频率的依赖性，进一步对凝胶样品进行频率扫描。对比图 4a 和 4b 可知，在同浓度 GA 下，与 GA 水凝胶相比，GA 乳液凝胶的 G′值明显要高，这进一步表明油滴作为活性填充物对凝胶网络的强化作用。乳液凝胶（图 4b）的 G′和 G″（特别是 G′）都表现出相对较弱的频率依赖性，说明样品的流变学响应受施加应力的影响很小[13]。在整个测试的频率范围，G′显著高于 G″，说明样品具有较高的凝胶强度。此外，即使在高频率下，样品也没有出现屈服点(G′=G″)，显示乳液凝胶在高频振荡下也没有出现凝胶-溶胶的转变。从图 4b 中还可以看到，G′值随着 GA 浓度的增加而增加，与振幅扫描的结果一致（图 3b），表明乳液凝胶的强度和流变学性质可通过简单地改变 GA 含量来进行调控。

2.3 乳液凝胶的微观结构

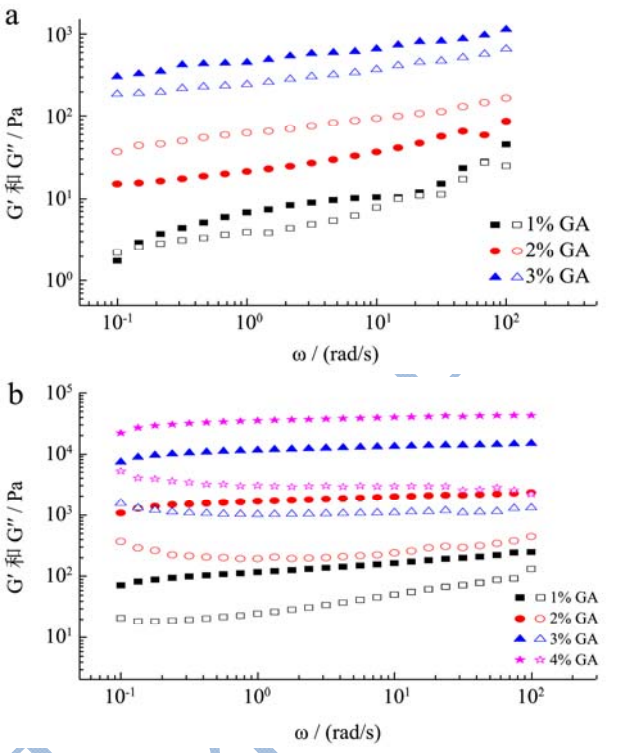


图 4 （a）不同 GA 浓度（1~4wt%）水凝胶的频率扫描图；（b）不同 GA 浓度（1~4wt%）乳液凝胶（油含量为 60%）的频率扫描图

Fig.4 Frequency sweeps for (a) GA hydrogels and (b) emulsion gels containing 60 wt% olive oil prepared at different GA concentrations (1~4 wt%)

注：G′和 G″分别用实心和空心图形表示。

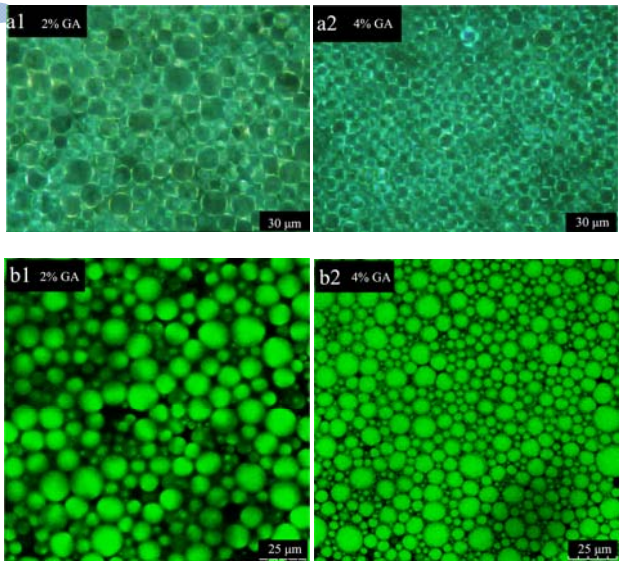


图 5 GA 浓度为 2wt%和 4wt%时乳液凝胶（油含量为 60%）的偏光显微镜（a）和激光共聚焦显微镜图片（b）

Fig.5 (a) Polarized light microscopy, and (b) confocal microscopy images of emulsion gels containing 60 wt% olive oil prepared using different GA concentrations (2 and 4 wt%)

注：（a）PLM，比例尺为 30 μm；（b）CSLM，比例尺为

25 μm，乳液凝胶用尼罗红对油脂进行染色。

有文献报道由于形成了纤维化网路结构，GA 水凝胶在偏光照射下可表现出强烈的双折射特性[11]，因此我们首先采用偏光显微镜对乳液凝胶的微观结构进行观察。从图 5a 偏光显微镜图片可以清晰地看到，所有乳液凝胶样品都具有多孔蜂窝状网络结构，油滴嵌在连续网络结构中。GA 浓度的提高可使网络的孔径变小，说明油滴尺度变小且更加紧密地存在于在网络结构中。图 5b 是利用尼罗红对油脂进行染色的激光共聚焦显微镜图片。可以看到随着 GA 浓度的提高，油滴直径减小且分布更为紧密，与图 5a 结果一致。另外，在 GA 浓度为 4%时，可以明显看到凝胶中嵌入的油滴发生变形，这应该是由油滴的紧密堆积导致的。以上微观结构观察结果与图 3 和图 4 凝胶流变学测试结果相一致。

2.4 乳液凝胶的稳定性及荷载能力

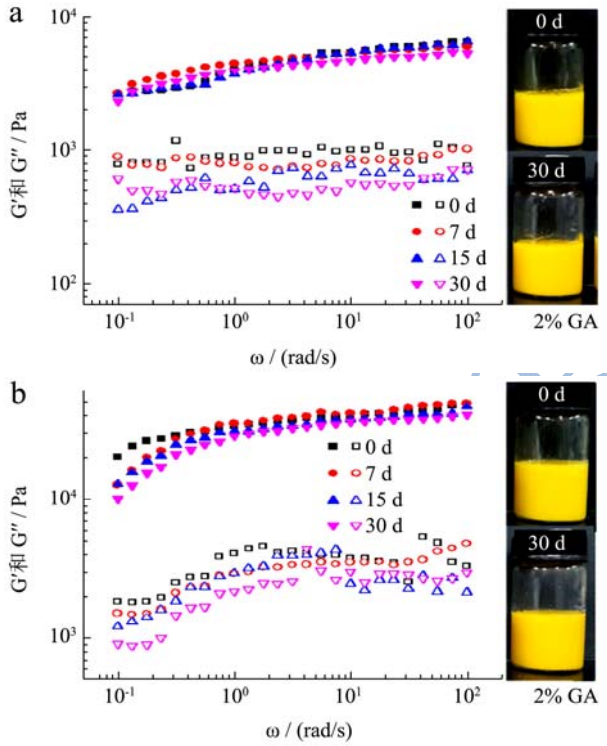


图 6 GA 浓度分别为 2wt%（a）和 4wt%(b)时添加 β-胡萝卜素（油含量的 0.1wt%）后乳液凝胶（油含量为 60%）的频率扫描及外观图

Fig.6 Photographs and frequency sweeps of emulsion gels (60 wt% olive oil) prepared with β-carotene (0.1 wt% of oil) and different GA concentrations (2 and 4 wt%)

注：G′和 G″分别用实心和空心图形表示。

乳液凝胶的一个重要应用就是可作为油溶性生物活性物质的输送体系，用于功能型食品、化妆品、药品等领域。因此，我们制备了荷载 β-胡萝卜素的乳液凝胶。从图 6 可以看到，β-胡萝卜素的添加对乳液凝胶的形成及结构影响不明显；而且荷载 β-胡罗卜素的乳液凝胶储藏稳定性也较好，在储藏 30 d 后凝胶的流变学性质及外观没有发生明显的变化，这说明 GA 基乳液凝胶具有较好的稳定性，具备作为活性物质输送介质的能力。

3 结论

本研究结果显示，天然两亲性小分子甘草酸可作为一种新型的材料用于植物油的结构化。制备的乳液凝胶油相含量高，具有多孔蜂窝状网络结构，而油滴则作为活性填充颗粒紧密堆积在凝胶网络中，以强化凝胶结构。同时荷载 β-胡萝卜素对凝胶结构性质影响不明显，乳液凝胶依然能保持良好的稳定性，显示出其作为油溶性生物活性物质输送载体的能力。这表明利用天然两性小分子甘草酸制备的乳液凝胶在功能性食品和药品等领域都具有广阔的应用前景。

参考文献

[1] Vintiloiu A, Leroux J C. Organogels and their use in drug delivery-A review [J]. Journal of Controlled Release Official Journal of the Controlled Release Society, 2008, 125(3): 179-192

[2] Hughes N E, Marangoni A G, Wright A J, et al. Potential food applications of edible oil organogels [J]. Trends in Food Science & Technology, 2009, 20(10): 470-480

[3] Simovic S, Milic-Askrabic J, Vuleta G, et al. The influence of processing variables on performance of o/w emulsion gels based on polymeric emulsifier (pemulen RTR-2NF) [J]. International Journal of Cosmetic Science, 1999, 21(2): 119-125

[4] Sánchez R, Franco J M, Delgado M A, et al. Development of new green lubricating grease formulations based on cellulosic derivatives and castor oil [J]. Green Chemistry, 2009, 11(5): 686-693

[5] Wang F C, Gravelle A J, Blake A I, et al. Novel trans fat replacement strategies [J]. Administration & Public Management Review, 2015, 7(11): 17

[6] Patel A R, Babaahmadi M, Lesaffer A, et al. Rheological profiling of organogels prepared at critical gelling concentrations of natural waxes in a triacylglycerol solvent [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2015, 63(19): 4862

[7] Schaink H M, Malssen K F V, Morgado-Alves S, et al. Crystal network for edible oil organogels: Possibilities and

limitations of the fatty acid and fatty alcohol systems [J]. Food Research International, 2007, 40(9): 1185-1193

[8] Constantinos V, Nikiforidis, Elke Scholten. Self-assemblies of lecithin and α-tocopherol as gelators of lipid material [J]. Rsc Advances, 2013, 4: 2466-2473

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

[10] Wang F C, Gravelle A J, Blake A I, et al. Novel trans fat replacement strategies [J]. Administration & Public Management Review, 2015, 7(11): 17

[11] Saha A, Adamcik J, Bolisetty S, et al. Fibrillar networks of glycyrrhizic acid for hybrid nanomaterials with catalytic features [J]. Angewandte Chemie International Edition, 2015, 54(18): 5408-5412

[12] Gao Y, Li Y, Zhao X, et al. First preparation of a triterpenoid-based supramolecular hydrogel in physiological phosphate buffered saline [J]. Rsc Advances, 2015, 5(123): 102097-102100

[13] Goodwin J W, Hughes R W. Rheology for chemists: an introduction [J]. Royal Society of Chemistry, 2008

现代食品科技