佛手精油脂质体的制备及其抗氧化活性

黄炜超[1]，汤酿[1]，刘静宜[1]，周爱梅[1,2]，黄凯信[2]，陈树喜[2]

（1.华南农业大学食品学院,广东省功能食品活性物重点实验室，广东广州 510642）

（2.广东展翠食品股份有限公司，华农（潮州）食品研究院有限公司，广东潮州 521000）

摘要：以大豆卵磷脂和胆固醇作为壁材，采用薄膜分散-高压均质法制备佛手精油脂质体。以脂质体粒径、Zeta 电位和包封率为指标筛选工艺参数和配方参数，确定脂质体最佳制备工艺，并对脂质体的形貌、稳定性进行考察，同时研究其抗氧化活性。结果表明，佛手精油脂质体的最佳制备工艺参数为：均质压力 120 MPa、均质次数 5 次、磷脂/胆固醇比例 5:1、精油添加量 3.5 mg/mL。在此条件下制备的脂质体粒径为 183.53 nm，PDI 多分散指数为 0.147，Zeta 电位值为 38.75 mV，包封率为 47.23%，载药量为 1.67 mg/mL。所制备的脂质体具有良好的离心稳定性、贮藏稳定性 4 ℃贮藏 30 d，精油保留率为 85.03%，对 DPPH、ABTS、羟基自由基的清除率分别为 82.58%、78.02%、70.89%。结论：在均质压力 120 MPa、均质次数 5 次、磷脂/胆固醇比例 5:1、精油添加量 3.5 mg/mL 的条件下，制备的脂质体粒径适中、稳定性良好，具有良好的抗氧化活性。

关键词：佛手精油；脂质体；薄膜分散-高压均质法；稳定性；表征

文章篇号：1673-9078(2020)06-211-218 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.6.1147

Preparation and Antioxidant Activity of Bergamot Essential Oil Liposomes

HUANG Wei-chao[1], TANG Niang[1], LIU Jing-yi[1], ZHOU Ai-mei[1,2], HUANG Kai-xin[2], CHEN Shu-xi[2]

(1.College of Food Science, South China Agricultural University, Guangdong Provincial Key Laboratory of Nutraceuticals and Functional Foods, Guangzhou 510642, China) (2.Guangdong Zhancui Food Co., Ltd, SCAV (Chaozhou) Food Institute Co., Ltd, Chaozhou 521000, China)

Abstract: Using soybean lecithin and cholesterol as wall materials, bergamot essential oil liposomes were prepared by membrane dispersion and high pressure homogenization. The parameters of preparation and formulation were selected according to the particle size, zeta potential and entrapment efficiency of liposome, and the optimal preparation process was determined. The morphology and stability of liposome were investigated, and its antioxidant activity was also studied. The optimal process parameters were obtained as follows：Homogenization pressure 120 MPa, homogenization times 5 times, phospholipid/cholesterol ratio 5:1, essential oil addition amount 3.5 mg/mL. The particle size of the liposome prepared under these conditions was 183.53 nm, the PDI polydispersity index was 0.147, the zeta potential value was 38.75 mV, encapsulation efficiency was 47.23%, and drug loading was 1.67 mg/mL. The liposomes had good centrifugation stability and storage stability for 30 days at 4 ℃, the retention rate of essential oil was 85.03%, and the scavenging rates of DPPH, ABTS and hydroxyl radicals were 82.58%, 78.02% and 70.89%, respectively. Conclusion: Under the conditions of homogenization pressure of 120 MPa, homogenization times of 5, ratio of phospholipid to cholesterol of 5:1, and the amount of essential oil of 3.5 mg/mL, the liposome prepared has moderate particle size, good stability and good antioxidant activity.

Key words: bergamot essential oil; liposome; film dispersion-high pressure homogenization method; stability; characterization

引文格式：

黄炜超,汤酿,刘静宜,等.佛手精油脂质体的制备及其抗氧化活性[J].现代食品科技,2020,36(6):211-218

HUANG Wei-chao, TANG Niang, LIU Jing-yi, et al. Preparation and antioxidant activity of bergamot essential oil liposomes [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(6): 211-218

收稿日期：2019-11-24

基金项目：广东省“扬帆计划”引进创新创业团队项目（2016YT03S056）

作者简介：黄炜超(1994-)，男，硕士研究生，研究方向：食品化学与配料

通讯作者：周爱梅(1971-)，女，博士，教授，研究方向：食品化学与营养及水产品加工

佛手为芸香科柑橘属植物香橼的变种，是一种传统的药食两用中药材。精油是佛手中主要活性成分之一，在佛手中含量可达 16 mL/kg[1]，其香味清香淡雅，令人愉悦，是一种重要的高档香料，在食品和化妆品中具有较高的应用价值，具有较广阔的市场前景。研究表明，佛手精油主要成分为萜烯类、倍半萜烯类及其含氧衍生物，如醇、醛、酮、酯等生理活性物质[2-4]，具有明显的抗菌、抗炎、抗氧化、抗肿瘤作用[5,6]，还具有抗抑郁、抗应激、舒缓情绪的作用[7,8]。

氧化应激对人体健康的影响已被越来越多的人关注，并且进行了大量的研究[9-11]，各种潜在的天然抗氧化剂的研发也越来越多。近年来，人们逐渐开始追求绿色天然无毒的抗氧化剂，植物精油因其抗氧化性良好而逐渐作为天然抗氧化剂的潜在来源之一。佛手精油具有良好的抗氧化活性，但因其水溶性和稳定性差、易挥发和氧化等缺陷限制了其应用范围。脂质体是由具有极性头的亲水端和非极性头的脂肪酸酰基、烷基或烷氧基碳氢化合物的尾端的双亲性分子，通常是由磷脂组成的双分子层膜的球形小泡[12]。采用脂质体包裹抗氧化剂，可克服其不稳定性的同时还有可能提高其生物利用性和货架期[13]。另外，由于脂质体作为运载体系的最大优点是可以同时包裹水溶性和油溶性的物质，这种同时包裹两种活性物质的脂质体被称为双功能脂质体[14]。因此，脂质体在包埋精油方面具有一般微胶囊和纳米乳液所没有的优势。目前，有较多的研究将不同的精油制备成脂质体，张雪婧[15]用薄膜分散法将豆蔻精油封装在脂质体内以提高其化学稳定性，在猪肉、鸡肉和牛肉中的长期抗菌实验中，相对于没有包埋的豆蔻精油，豆蔻精油脂质体可以使肉的品质保持更长的时间；葛彦[16]利用薄膜水化超声法制备茶树精油脂质体，并研究了其缓释性能与抗菌性能，结果表明茶树精油脂质体能够延缓精油中成分的释放，并且具有显著的抗菌效果；Tang[17]等通过静电自组装成功制备了新型桉树精油脂质体/壳聚糖复合海绵，研究了其抗菌效果；赵呈婷[18]使用薄膜-超声分散法制备出丁香精油脂质体，结果表明丁香精油脂质体能够发挥长效杀菌作用。以上研究结果表明，许多精油在制备成脂质体后其稳定性增加，能够使精油的效果保留更长的时间。为了探究佛手精油脂质体的制备条件及其稳定性，制备成脂质体后的抗氧化活性变化，本文以大豆卵磷脂和胆固醇作为壁材，采用薄膜分散-高压均质法制备佛手精油脂质体，以脂质体粒径、Zeta 电位和包封率为评价指标筛选脂质体的最佳制备工艺，并对脂质体的形貌和稳定性进行考察，同时考察其抗氧化活性变化，为解决佛手精油的应用限制问题提供一种可能的思路。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

佛手精油，华南农业大学食品学院天然活性物研究中心提供；大豆卵磷脂（纯度 98%）、胆固醇（纯度 98%），上海源聚生物科技有限公司；无水乙醇（色谱纯），天津市科密欧化学试剂有限公司；1,1-二苯基-2-苦基肼自由基（DPPH），梯希爱（上海）化成工业发展有限公司；2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐（ABTS），上海阿拉丁生化科技股份有限公司；其余试剂均为国产分析纯。

90 plus 纳米粒度及 Zeta 电位仪，美国布鲁克海文仪器有限公司；FJ200-S 高速分散均质机，上海嫩谷机电设备有限公司；scientz-150 高压均质机，宁波新芝生物科技股份有限公司；Enspire2003 多功能酶标仪，美国 PerkinElmer 公司；5417R 高速冷冻离心机，德国 Eppendorf 公司；TSQ-8000 气相色谱-质谱联用仪，美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 佛手精油脂质体的制备工艺

将大豆卵磷脂和胆固醇以一定的比例和一定质量的精油溶于 50 mL 三氯甲烷中，在圆底烧瓶中振荡混匀，于 35 ℃左右条件下减压旋转蒸发除去有机溶剂，使脂质在器壁形成薄膜，然后加入 0.05 g PVP（聚乙烯吡咯烷酮），再加入 50 mL 的 PBS（0.03 mol/L，pH 7.2~7.4）缓冲液，水浴超声搅拌一定时间使脂质水化，所得混悬液经高速分散均质机在 10000 r/min 条件下均质 2 min，再经高压均质机循环均质得到一定粒径的脂质体。

1.2.2 佛手精油脂质体制备的配方和工艺参数确定

采用 1.2.1 的方法制备佛手精油脂质体。对影响佛手精油脂质体性质的主要因素包括配方（卵磷脂、胆固醇的组成比例，精油添加量）和工艺参数（均质压力，均质次数）进行筛选，以确定制备佛手精油脂质体的最佳条件。考察指标为脂质体粒径、电位以及包封率。

1.2.2.1 均质压力

以磷脂:胆固醇比例为 4:1，精油添加量为 3 mg/mL，水化时间为 60 min，均质次数为 4 次，考察不同均质压力（60 MPa、80 MPa、100 MPa、120 MPa、140 MPa）。对佛手精油脂质体的影响。

1.2.2.2 均质次数

其他条件同 1.2.2.1，均质压力为 120 MPa，考察不同均质次数（2 次、3 次、4 次、5 次、6 次）对佛手精油脂质体的的影响。

1.2.2.3 磷脂/胆固醇比例

其他条件同 1.2.2.3，均质次数为 5 次，考察不同磷脂:胆固醇比例（2:1、3:1、4:1、5:1、6:1）对佛手精油脂质体的影响。

1.2.2.4 精油添加量

其他条件同 1.2.2.3，以磷脂:胆固醇比例为 5:1，考察不同精油添加量（2 mg/mL、2.5 mg/mL、3 mg/mL、3.5 mg/mL、4 mg/mL）对佛手精油脂质体的影响。

1.2.3 佛手精油脂质体稳定性的研究

1.2.3.1 离心稳定性

参考吴滋灵[19]的方法并做适当修改。将一定量的佛手精油脂质体乳液置于离心机中，在 10000 r/min 的离心作用力下分别离心 2 min、5 min，考察脂质体在离心后有无分层变化，并对其进行表征。

1.2.3.2 贮藏稳定性

参考 Li 等[20]的方法并稍作修改。将所制备的脂质体乳液充氮，在 4 ℃下避光贮藏 3 d、7 d、12 d、18 d、24 d、30 d 后测量粒径、电位变化，并通过 GC-MS 气相色谱质谱联用仪测定佛手精油脂质体在不同储存时间内佛手精油的保留率。计算公式如（1）所示：

$$\text{佛手精油保留率}/\% = \frac{\text{贮藏指定时间内脂质体中佛手精油的包埋量}}{\text{贮藏前脂质体中佛手精油的包埋量}} \times 100\% \quad (1)$$

1.2.4 佛手精油脂质体的表征

1.2.4.1 粒径测定

取不同条件下制备的脂质体乳液，用蒸馏水稀释 100 倍后取适量于测定样品池中，通过激光动态光散射法（DLS）测定脂质体在乳液中的有效直径（Eff. Diam）及分散情况和多分散指数（PDI）。

1.2.4.2 表面 Zeta 电位的测定

取不同条件下制备的脂质体乳液，用蒸馏水稀释 100 倍后取适量于测定样品池中，利用 Zeta 电位仪测定脂质体的 Zeta 电位。

1.2.4.3 包封率的测定

参考周慧[21]的方法，采用 GC-MS 气相色谱质谱联用仪测定佛手精油脂质体的包封率。用色谱纯的无水乙醇分别精确配置不同浓度的佛手精油乙醇溶液作为标准溶液。将标准溶液进行 GC-MS 分析，对其主要成分柠檬烯进行自动积分，绘制柠檬烯峰面积-佛手精油浓度标准曲线。

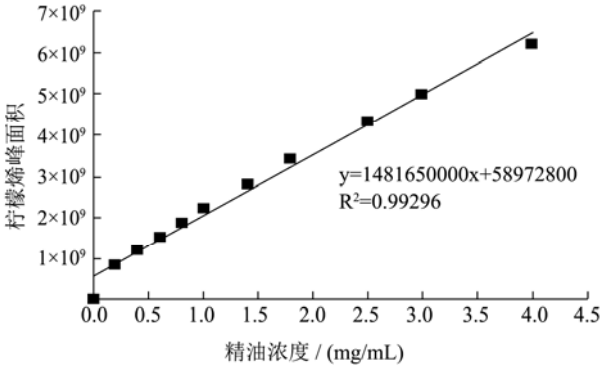


图 1 柠檬烯峰面积−佛手精油浓度标准曲线

Fig.1 Standard curve of limonene peak area - bergamot essential oil concentrations

将佛手精油脂质体乳液以 20000 r/min 高速离心 1 h，去除上清液后加入同等体积的色谱纯无水乙醇，超声波处理 1 h 后离心取上清液进行 GC-MS 分析，再根据浓度标准曲线，计算出脂质体中精油的含量。脂质体包封率的计算公式如公式（2）所示：

$$\text{包封率}\ (\%) = \frac{\text{脂质体中包埋的佛手精油的含量}}{\text{初始添加的佛手精油的总量}} \times 100\% \quad (2)$$

柠檬烯标准曲线如图 1 所示，Y=1481650000X+58972800，R^2=0.99296。

1.2.4.4 微观形貌分析

采用透射电子显微镜（Transmission electron microscopy，TEM）观察佛手精油脂质体的表观形态及大小。参考 Lu[22]等的方法并稍作修改。将干净的铜网浸没于佛手精油脂质体乳液中后取出，2 min 后吸去多余的脂质体乳液，用 2%的磷钨酸染色 5 min 后吸去多余的染液，自然风干后进行电镜观察，测试加速电压为 200 kV。

1.2.5 佛手精油脂质体的抗氧化活性评价

1.2.5.1 DPPH 自由基清除能力

参考 Bistgani、Yuan 等[23,24]的方法并稍作修改。精确吸取 1 mL 佛手精油脂质体与 1 mL 同浓度的佛手精油溶液分别与 3 mL 0.15 mmol/L 的 DPPH·乙醇溶液混合均匀，于暗处反应 30 min 后在 4000 r/min 离心 30 min，取上清液测其在 525 nm 处的吸光值 A_1，以 PBS 缓冲液代替样品作为空白对照，测其吸光值 A_0，以无水乙醇代替 DPPH 溶液作为对照，测其吸光值 A_2。按式（3）计算 DPPH 自由基清除率：

$$\text{DPPH自由基清除率}\ (\%) = 1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0} \times 100\% \quad (3)$$

1.2.5.2 ABTS 自由基清除能力

参照 Ayyanna[25]等的方法并做适当修改。取 7 mmol/L ABTS 溶液 5 mL 与 88 μL 的 140 mmol/L 过硫

酸钾溶液混合，室温、避光静置过夜（15 h），形成 $ABTS^+$自由基储备液。使用前用超纯水稀释成在 30 ℃、734 nm 波长下的吸光度为 0.7±0.02 的工作液。

吸取 1 mL 佛手精油脂质体与 1 mL 同浓度的佛手精油溶液分别与 3 mL ABTS 工作液混合，振荡混匀，在 4000 r/min 离心 30 min 后吸取上清液读取 734 nm 波长下的吸光度 A_1，以 3 mL ABTS 工作液加 1 mL 无水乙醇作空白对照，测定其吸光度 A_0。以 1 mL 样品加 3 mL 无水乙醇混合均匀作为对照样，测定其吸光度为 A_2。按式（4）计算 ABTS 自由基清除率：

$$\text{ABTS自由基清除率}\ (\%)=1-\frac{A_1-A_2}{A_0}\times 100\% \quad (4)$$

1.2.5.3 羟基自由基清除能力

采用结晶紫法测定，具体参照刘俊[26]的方法并做适当修改。在 10 mL 比色管中分别加入 0.3 mL 2 mmol/L 结晶紫溶液、0.6 mL 2.0 mmol/L 过氧化氢溶液以及 1.2 mL 1.0 mmol/L 硫酸亚铁溶液。用 pH 4 的磷酸柠檬酸缓冲液将上述溶液定容至 10 mL，静置 0.5 h 后，在 580 nm 测其吸光值 A_2，在上述体系加入过氧化氢之前分别加入 3.5×10^{-3} mg/mL 的精油 0.5 mL、稀释 100 倍后的脂质体乳液 0.5 mL，测其吸光值 A_1，不加过氧化氢时 580 nm 处的吸光值为 A_0。按公式（5）计算羟基自由基清除率：

$$\text{羟基自由基清除率}\ (\%)=\frac{A_1-A_2}{A_0-A_2}\times 100\% \quad (5)$$

1.3 数据处理

实验数据采用 Origin 9.0 软件作图，SPSS Statistics 17.0.1 软件进行方差分析，所有实验均重复 3 次。

2 结果与讨论

2.1 佛手精油脂质体制备的配方和工艺参数确定

2.1.1 均质压力的确定

均质压力的大小主要对脂质体的粒径产生影响，而粒径的大小又影响脂质体的包封率。均质压力对佛手精油脂质体的粒径、电位和包封率的影响如图 2 所示。由图可以看出，随着均质压力的增加，脂质体粒径显著减小（$p<0.05$），而包封率下降的速度较缓慢，压力达到 100 MPa 后包封率下降无显著性差异（$p<0.05$）。均质压力从 60 MPa 增加到 120 MPa 时，粒径从 589.36 nm 下降到 212.15 nm，而包封率从 57.45%下降到 43.24%，此时虽然包封率下降，但是其分布更集中，粒径大小更合适，稳定性较好，在 60 MPa 时包封率虽然最高，但是其粒径较大，稳定性较差；进一步增大压力到 140 MPa 时，粒径反而增大到 376.52 nm，这可能是因为当均质压力过大时，形成的脂质体粒径过小（直径<100 nm），导致脂质体颗粒因表面张力过大而破裂，脂质体易出现互溶现象而重组为粒径更大的脂质体，一般脂质体粒径在 200 nm 左右比较合适，既能够保持一定的稳定性，又可以提高包埋物的利用率[21,27]。80 MPa 至 140 MPa 之间的电位值均在 30 mV~60 mV 之间，PDI 均在 0.35 以下，且在 120 MPa 时 PDI 最低，为 0.172。所以根据实验结果综合考虑，选定均质压力为 120 MPa 作为最佳制备压力。

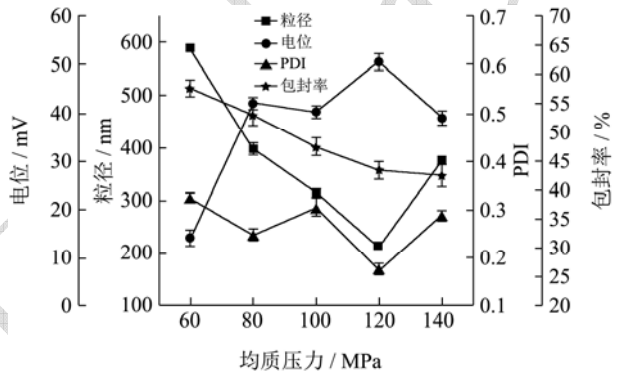


图 2 均质压力对脂质体粒径、电位、PDI 及包封率的影响

Fig.2 Effect of homogenization pressure on liposome size, electric potential, PDI and encapsulation efficiency

2.1.2 均质次数的确定

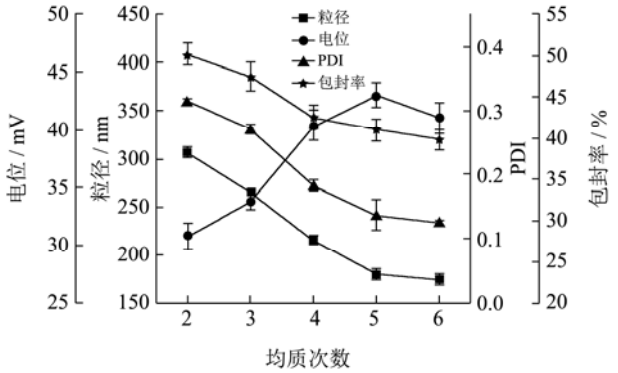


图 3 均质次数对脂质体粒径、电位、PDI 及包封率的影响

Fig.3 Effect of homogeneous frequency on liposome size, electric potential, PDI and encapsulation efficiency

均质次数对脂质体粒径和包封率的影响如图 3 所示。脂质体的包封率、粒径和 PDI 都随着均质次数的增加而降低，包封率和粒径变化不如均质压力的影响显著，当均质次数从 2 次增加到 5 次时，粒径由 306.34 nm 下降到 172.73 nm，电位值由 30.51 mV 增加到 42.95 mV，电位值均在 30 mV~45 mV 之间，均处于较稳定的状态，PDI 由 0.314 减小到 0.124，说明增加均质次

数能够使脂质体的粒径减小，处于分布更均一的状态，均质次数达到 5 次以后脂质体的粒径和 PDI 减少不显著（p>0.05），因此将均质次数定为 5 次。

2.1.3 磷脂/胆固醇比例的确定

胆固醇可以起到调节磷脂双分子层的通透性和流动性等作用，所以能够影响所制备的脂质体的稳定性和药物释放，因此合适的磷脂/胆固醇比例有利于制备稳定性好、包封率高的脂质体。实验结果如图 4 所示。由图可以看出，随着磷脂/胆固醇比例的增大，包封率显著上升（p<0.05），从 21.32%增加到 46.25%，但粒径波动不大，从 192.76 nm 下降到 178.61 nm，当磷脂/胆固醇比例达到 6:1 时，包封率增大趋势变缓。胆固醇含量过高时不利于亲脂性物质的包埋，胆固醇穿插在磷脂分子的亲脂性尾部之间，连接两个磷脂分子[28]，适量的胆固醇可以增加磷脂脂质体膜的刚性，起到稳定磷脂双分子层结构的作用，但过量的胆固醇会使双分子层超过可容纳的限度，造成双分子层的破坏，使脂质体失去稳定的结构最终导致破裂[29,30]。所以综合考虑，确定磷脂/胆固醇比例为 5:1。

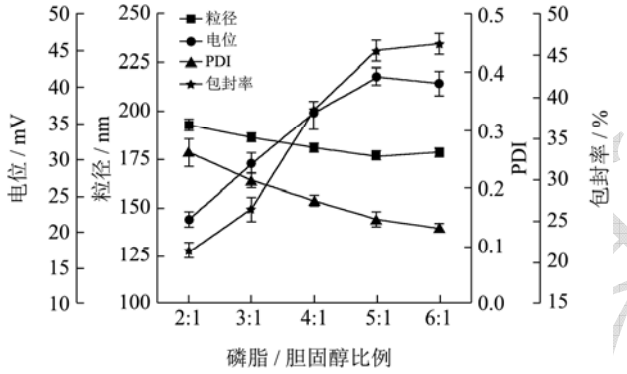


图 4 磷脂/胆固醇比例对脂质体粒径、电位、PDI 及包封率的影响

Fig.4 Effect of phospholipid/cholesterol ratio on liposome size, electric potential, PDI and encapsulation efficiency

2.1.4 精油添加量的确定

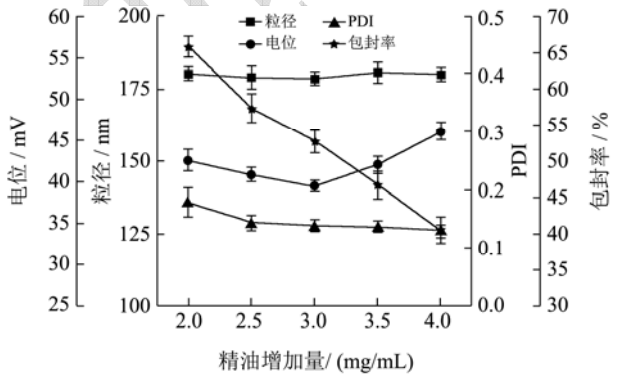


图 5 精油添加量对脂质体粒径、电位、PDI 及包封率的影响

Fig.5 Effect of essential oil addition on liposome size, electric potential, PDI and encapsulation efficiency

如图 5 所示，精油添加量对包封率的影响较大，当精油添加量从 2 mg/mL 增加到 4mg/mL 的时候，包封率呈显著下降的趋势（p<0.05），从 65.79%下降到 40.34%。精油添加量从 2.0 mg/mL 增加到 3.5 mg/mL 时，包封率从 65.79%下降到 46.62%，但载药量从 1.32 mg/mL 增加到 1.63 mg/mL，精油添加量达到 4.0 mg/mL 时，包封率进一步下降到 40.33%，载药量较精油添加量为 3.5 mg/mL 时略有下降，为 1.61 mg/mL。说明一定量的磷脂形成的脂质体对佛手精油的包埋量是有限的，精油添加量少时包封率虽然高但是载药量较低，随着精油添加量的增加，包封率虽然逐渐下降，但是载药量在逐渐增加并逐渐接近脂质膜的饱和度并不再增加[16]。精油添加量对粒径的影响较小，粒径波动范围不大，无显著性差异（p<0.05），均在 180 nm 左右，电位值均在 35~50 mV 之间，均处于稳定的状态，PDI 波动范围较小，无显著性差异（p<0.05）。因此，综合考虑将精油添加量定为 3.5 mg/mL。

2.2 佛手精油脂质体制备最佳工艺的验证与表征

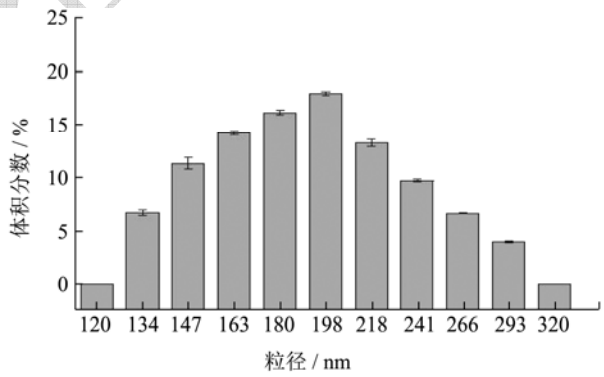


图 6 佛手精油脂质体粒径分布

Fig.6 Particle size distribution of bergamot essential oil liposome

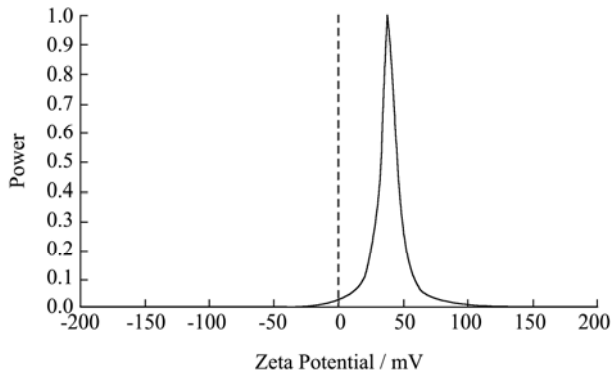


图 7 佛手精油脂质体的表面电势

Fig.7 Surface potential of bergamot essential oil liposomes

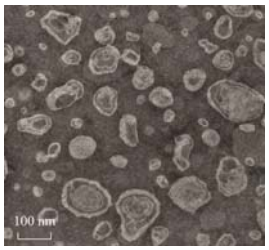


图 8 佛手精油脂质体透射电镜图

Fig.8 Transmission electron micrograph of bergamot essential oil liposome

由上述实验得出佛手精油脂质体的最佳制备工艺为：均质压力 120 MPa、均质次数 5 次、磷脂/胆固醇比例 5:1、精油添加量 3.5 mg/mL。在此条件下制备的脂质体粒径为 183.53 nm，PDI 为 0.147，Zeta 电位值为 38.75 mV，包封率为 47.23%，载药量为 1.67 mg/mL。脂质体粒径分布如图 6 所示，粒径分布在 134 nm 到 293 nm 之间，集中分布在 160 nm~220 nm 之间，呈单峰分布，说明本实验制备的脂质体粒径在适当的范围内，具有一定的相对稳定性[31]。脂质体表面电势如图 7 所示，表面 Zeta 电位值处在 30 mV 与 60 mV 之间，带电荷粒子比较稳定。表面 Zeta 电位是衡量脂质体表面电荷多少的重要指标，Zeta 电位在-30mV~+30 mV 之间时，带电荷粒子容易发生聚集而不稳定。小于-30 mV 或大于 30 mV 都被视为高 Zeta 电位，处于比较稳定的状态[32]。图 8 为佛手精油脂质体微观形貌的 TEM 分析，由图可以看出，佛手精油脂质体呈不规则圆球状，可以明显看到脂质体的双分子层的双层结构，说明所制备的脂质体形成了双分子层结构，粒径分布较均一。以上结果说明本实验制备的脂质体粒径适中，稳定性较好，通过透射电镜观察可见明显的双分子层结构。

2.3 佛手精油脂质体稳定性研究

2.3.1 离心稳定性

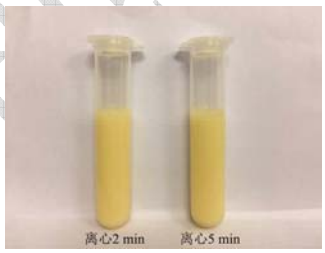


图 9 脂质体样品离心后图

Fig.9 Liposomal sample after centrifugation

取 5 mL 脂质体乳液于 10 mL 离心管中，分别在 10000 r/min 下离心 2 min 和 5 min，如图 9 所示，两组均无明显分层现象或沉淀，说明所制备的脂质体乳液具备良好的离心稳定性，在一定的离心力作用下仍能保持较均一的状态，通过测量离心后脂质体的粒径、电位、PDI 以及包封率（图 10）发现均无显著性差异（p<0.05）。

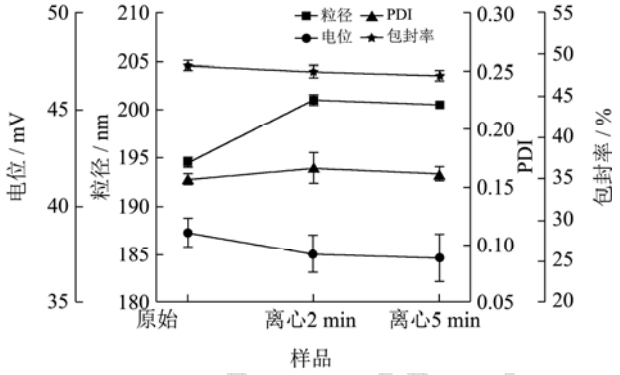


图 10 离心对脂质体粒径、电位和包封率的影响

Fig.10 Effect of centrifugation on liposome size and encapsulation efficiency

2.3.2 贮藏稳定性

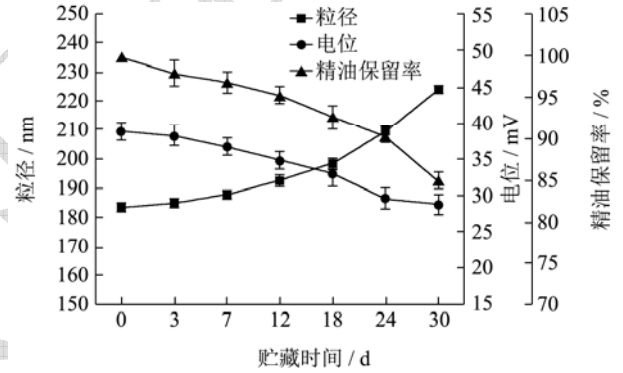


图 11 贮藏时间对佛手精油脂质体稳定性的影响

Fig.11 Effect of storage time on the stability of bergamot essential oil liposomes

通过将脂质体乳液充氮后 4 ℃避光保存，在贮藏时间第 3 d、7 d、12 d、18 d、24 d、30 d 时分别测量脂质体的粒径、电位以及脂质体中的佛手精油保留率，实验结果如图 11 所示。随着贮藏时间的增加，脂质体粒径逐渐增大（p<0.05），并且增加速度逐渐加快，在第 30 d 时粒径由起始的 183.53 nm 增大为 223.57 nm，说明随着贮藏时间的增加，磷脂膜之间发生相互作用，粒径呈现逐渐增大的趋势。Zeta 电位随贮藏时间的增加呈下降的趋势（p<0.05），在第 30 d 时，Zeta 电位从第 0 d 的 38.75 mV 下降到 28.36 mV，仍然处在较稳定的状态。精油保留率随着贮藏时间的增加也呈现逐渐下降的趋势（p<0.05），贮藏 30 d 后脂质体包埋的精油损失 14.97%，损失较少。上述结果说明，本实验所制备的佛手精油脂质体在溶液中具有良好的稳定性，不易解离与聚集。

2.4 佛手精油脂质体的抗氧化活性评价

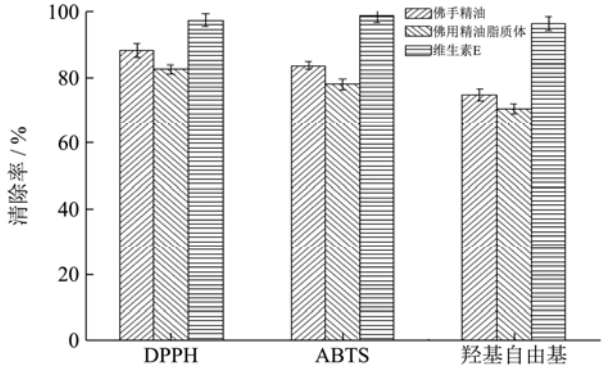


图 12 佛手精油脂质体抗氧化研究

Fig.12 Antioxidant study of bergamot essential oil liposome

佛手精油脂质体的抗氧化结果如图 12 所示。佛手精油脂质体对 DPPH 自由基的清除率为 82.58%，同浓度佛手精油为 88.23%，维生素 E 为 97.45%；对 ABTS 自由基的清除率为 78.02%，同浓度佛手精油为 83.63%，维生素 E 为 98.71%；对羟基自由基的清除率为 70.89%，同浓度佛手精油为 74.84%，维生素 E 为 96.37%。佛手精油脂质体溶液与佛手精油溶液抗氧化性均显著弱于同浓度下维生素 E 溶液（$p<0.001$），但也均能表现出较良好的抗氧化能力。脂质体清除自由基的能力要弱于同浓度下佛手精油溶液（$p<0.05$），原因可能为佛手精油包埋进脂质体后其供电子能力会受到磷脂双分子层的干扰，导致其清除自由基能力的下降[33,34]。虽然佛手精油脂质体清除自由基能力略低于佛手精油溶液，但将佛手精油包埋后其稳定性提高，在贮藏一定的时间后仍能发挥较好的抗氧化效果。

3 结论

在均质压力 120 MPa、均质次数 5 次、磷脂/胆固醇比例 5:1、精油添加量 3.5 mg/mL、水化时间 75 min 条件下，制备的脂质体粒径粒径适中，粒径分布较集中，Zeta 电位处于较稳定的状态，贮藏稳定性及离心稳定性较好。在透射电子显微镜下观察，脂质体粒径分布均匀，能够明显看到磷脂双分子层结构。说明此工艺条件下制备的脂质体形成了双分子层结构，且稳定性较好。同时，所制备的佛手精油脂质体对 DPPH、ABTS 和羟基自由基的清除率分别为 82.58%、78.02%、70.89%，表现出良好的抗氧化性，虽较佛手精油略低，但在效果持续上具有一定的优势。由于佛手精油稳定性差，不溶于水，将佛手精油制备成脂质体，不仅增加了其稳定性，也增加了其应用范围，本文只研究了佛手精油脂质体的抗氧化效果，后期可继续研究其抗菌等应用效果。本研究为佛手精油的应用提供了更广阔的思路。

参考文献

[1] 王俊华,符红.广佛手挥发油化学成分的GC-MS分析[J].中药材,1999,10:516-517
WANG Jun-hua, FU Hong. GC-MS analysis of chemical constituents of volatile oil from Canton bergamot [J]. Chinese Medicinal Materials, 1999, 10: 516-517

[2] 魏玉君,邵邻相,麻艳芳,等.佛手叶挥发油的成分分析及生物活性研究[J].浙江师范大学学报(自然科学版),2014,37(3):329-333
WEI Yu-jun, SHAO Lin-xiang, MA Yan-fang, et al. Study on constituents and biological activity of volatile oil from fingered citron leaves [J]. Journal of Zhejiang Normal University (Natural Science Edition), 2014, 37(3): 329-333

[3] 杨慧,周爱梅,林敏浩,等.佛手挥发精油提取及其药理研究进展[J].食品安全质量检测学报,2013,4(5):1347-1352
YANG Hui, ZHOU Ai-mei, LIN Min-hao, et al. Research progress of extraction methods and pharmacological effects of bergamot essential oil [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2013, 4(5): 1347-1352

[4] 钟艳梅,田庆龙,肖海文,等.不同产地佛手药材的化学成分比较研究[J].中南药学,2014,12(1):63-66
ZHONG Yan-mei, TIAN Qing-long, XIAO Hai-wen, et al. Chemical constituents of Fructus citri Sarcodactylis from different places [J]. Central South Pharmacy, 2014, 12(1): 63-66

[5] Forlot P, Pevet P. Bergamot (*Citrus bergamia Risso* et Poiteau) essential oil: Biological properties, cosmetic and medical use. A review [J]. Journal of Essential Oil Research, 2012, 24(2SI): 195-201

[6] Bagetta G, Morrone L A, Rombola L, et al. Neuropharmacology of the essential oil of bergamot [J]. Fitoterapia, 2010, 81(6): 453-461

[7] Saiyudthong S, Marsden C A. Acute effects of bergamot oil on anxiety-related behaviour and corticosterone level in rats [J]. Phytotherapy Research, 2011, 25(6): 858-862

[8] Kim Y. The anti-stress effects of essential oils [J]. The Korean Society of Beauty and Art, 2018, 19(2): 187-196

[9] Lu X, Zhang E, Yin S, et al. Methylseleninic acid prevents patulin-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity *via* the inhibition of oxidative stress and inactivation of p53 and MAPKS [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(26): 5299-5305

[10] Lutz W, Krajewska B. An oxidative stress as a basic mechanism of carcinogenic effect of man made mineral fibres

on the human body [J]. Medycyna Pracy, 1995, 46(3): 275-284

[11] Pan X, Qin P, Liu R, et al. Effects of carbon chain length on the perfluoroalkyl acids-induced oxidative stress of erythrocytes *in vitro* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(25): 6414-6420

[12] Gharib Riham, Auezova Lizette, Charcosset Catherine, et al. Drug-in-cyclodextrin-in-liposomes as a carrier system for volatile essential oil components: Application to anethole [J]. Food Chemistry, 2017, 218(1):365-371.

[13] Nieto G, Huvaere K, Skibsted L H. Antioxidant activity of rosemary and thyme by-products and synergism with added antioxidant in a liposome system [J]. European Food Research and Technology, 2011, 233(1): 11-18

[14] Uhumwangho M, Okor R. Current trends in the production and biomedical applications of liposomes: A review [J]. Journal of Medicine and Biomedical Research, 2005, 4(1): 9-21

[15] 张雪婧.刺激释放型豆蔻精油纳米脂质体的制备及在肉类食品中的应用[D].镇江:江苏大学,2016
ZHANG Xue-jing. Preparation of stimulated-release cardamom essential oil nano-liposomes and its application in meat foods [D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2016

[16] 葛彦.茶树精油脂质体/壳聚糖缓释抗菌材料的制备及性能研究[D].镇江:江南大学,2015
GE Yan. Preparation and properties of tea tree essential oil liposome/chitosan sustained-release antibacterial material [D]. Zhenjiang: Jiangnan University, 2015

[17] Tang J, Ge Y. Development and evaluation of novel eucalyptus essential oil liposomes/chitosan composite sponges for medical use [J]. Fibers and Polymers, 2017, 18(3): 424-433

[18] 赵呈婷.刺激响应型丁香精油脂质体对金黄色葡萄球菌的抑制作用及其在豆制品中的应用研究[D].镇江:江苏大学, 2016
ZHAO Cheng-ting. Study on the inhibition of staphylococcus aureus by stimulus-responsive liposomes and its application in soybean products [D]. Zhengjiang: Jiangsu University, 2016

[19] 吴滋灵.玉米醇溶蛋白胶体颗粒稳定的高内相Pickering乳液制备及其营养输送特性研究[D].广州:华南理工大学, 2018
WU Zi-ling. Preparation of high internal phase pickering emulsion with stable zein colloidal particles and its nutrition delivery characteristics [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2018

[20] Li P, Lu W. Effects of storage conditions on the physical stability of D-limonene nanoemulsion [J]. Food Hydrocolloids, 2016, 53: 218-224

[21] 周慧.鼠尾草精油纳米脂质体对金黄色葡萄球菌生物膜的控制释放研究[D].镇江:江苏大学,2016
ZHOU Hui. Controlled release of sage essential oil nanoliposomes on *Staphylococcus aureus* biofilm [D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2016

[22] Lu W, Chiang B, Huang D, et al. Skin permeation of D-limonene-based nanoemulsions as a transdermal carrier prepared by ultrasonic emulsification [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2014, 21(2): 826-832

[23] Bistgani Z E, Siadat S A, Bakhshandeh A, et al. Application of combined fertilizers improves biomass, essential oil yield, aroma profile, and antioxidant properties of Thymus daenensis celak [J]. Industrial Crops and Products, 2018, 121: 434-440

[24] Yuan B, Xue L, Zhang Q, et al. Essential oil from sweet potato vines, a potential new natural preservative, and an antioxidant on sweet potato tubers: assessment of the activity and the constitution [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016, 64(40): 7481-7491

[25] Ayyanna R, Ankaiah D, Arul V. Anti-inflammatory and antioxidant properties of probiotic bacterium lactobacillus mucosae an1 and lactobacillus fermentum snr1 wistar albino rats [J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9(3063)

[26] 刘骏.结晶紫分光光度法测定Fenton反应产生的羟自由基[J].武汉工业学院学报,2005,2:53-55
LIU Jun. Spectrophotometric determination of hydroxyl radicals produced by Fenton reaction with crystal violet [J]. Journal of Wuhan Polytechnic University, 2005, 2: 53-55

[27] 葛彦.茶树精油脂质体/壳聚糖缓释抗菌材料的制备及性能研究[D].无锡:江南大学,2015
GE Yan. Preparation and properties of tea tree essential oil liposome/chitosan sustained-release antibacterial material [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2015

[28] Liu W, Wei F, Ye A, et al. Kinetic stability and membrane structure of liposomes during *in vitro* infant intestinal digestion: Effect of cholesterol and lactoferrin [J]. Food Chemistry, 2017, 230: 6-13

[29] 杨贝贝.甾醇对卵磷脂脂质体性质的影响[D].无锡:江南大学,2013
YANG Bei-bei. Effect of sterols on the properties of lecithin liposomes [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2013

（下转第 210 页）